



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

**Departamento de Fisiología, Anatomía
y Biología Celular**

**“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA
TIORREDOXINA MITOCONDRIAL DE
Caenorhabditis elegans”**

**TESIS DOCTORAL
Briseida Belí Cacho Valadez**

Sevilla, 2012



El **Dr. Antonio Miranda Vizuite**, científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA:

Que la licenciada **Briseida Belí Cacho Valadez** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA TIORREDOXINA MITOCONDRIAL DE *Caenorhabditis elegans***”, el cual reúne las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Sevilla, a 18 de enero de 2012.

Fdo. Dr. Antonio Miranda Vizuite



Esta Tesis Doctoral fue realizada en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo bajo la dirección del Dr. Antonio Miranda Vizuite. El proyecto fue financiado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por la Junta de Andalucía dentro de sus Proyectos de Excelencia y por el Instituto de Salud Carlos III – Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). Asimismo, el presente trabajo fue realizado gracias a la concesión de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) del gobierno mexicano.



ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	i
Índice de figuras	iii
Abreviaturas	v
Resumen	vii
Lista de publicaciones	viii
Capítulo I. Introducción	1
1.1 La mitocondria	3
1.2 El genoma mitocondrial	4
1.3 Las funciones de la mitocondria	6
1.3.1 Fosforilacion oxidativa	6
1.3.2 Apoptosis	8
1.4 Enfermedades humanas asociadas a desórdenes mitocondriales	11
1.4.1 Desórdenes mitocondriales adscritos a mutaciones en el ADNmt	12
1.4.2 Desórdenes mitocondriales adscritos a mutaciones en genes nucleares que codifican a proteínas con localización mitocondrial	14
1.4.3 Enfermedades neurodegenerativas	15
1.4.3.1 Enfermedad de Alzheimer	15
1.4.3.2 Enfermedad de Parkinson	18
1.4.4 La calidad mitocondrial y el envejecimiento	20
1.5 Formación de especies reactivas de oxígeno	22
1.5.1 Daño causado por especies reactivas de oxígeno	23
1.6 Sistemas antioxidantes	24
1.6.1 El sistema tiorredoxina	26
1.6.1.1 Tiorredoxinas	26
1.6.1.1.1 La tiorredoxina mitocondrial	29
1.6.1.2 Tiorredoxina reductasas	30
1.6.1.2.1 Tiorredoxina reductasa mitocondrial	33
1.7 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	34
1.7.1 Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	36

1.7.2	Anatomía de <i>C. elegans</i>	38
1.7.3	<i>C. elegans</i> en el estudio del envejecimiento	42
1.7.4	<i>C. elegans</i> como organismo modelo en el estudio de patologías humanas	48
Capítulo II. Objetivos		53
Capítulo III. Resultados		57
3.1	Identificación del sistema tiorredoxina mitocondrial en <i>C. elegans</i>	59
3.2	Estudio de la actividad enzimática de <i>trx-2</i> de <i>C. elegans</i>	62
3.3	Estudio de la expresión del sistema tiorredoxina mitocondrial de <i>C. elegans</i>	65
3.4	Caracterización genética de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial	72
3.5	Análisis fenotípico de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial de <i>C. elegans</i>	77
3.5.1	El sistema tiorredoxina mitocondrial en la apoptosis de <i>C. elegans</i>	80
3.5.2	Respuesta del sistema tiorredoxina mitocondrial de <i>C. elegans</i> frente al estrés oxidativo	83
3.5.3	Papel del sistema tiorredoxina mitocondrial de <i>C. elegans</i> en la respuesta a estrés de proteínas mal plegadas (UPR)	88
3.5.4	Longevidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial	93
3.5.5	El sistema tiorredoxina mitocondrial en modelos de enfermedades neurodegenerativas en <i>C. elegans</i>	96
Capítulo IV. Discusión		109
Capítulo V. Conclusiones		121
Capítulo VI. Materiales y Métodos		125
6.1	Estirpes y medios de cultivo	127
6.1.1	Lista de estirpes de <i>C. elegans</i>	127
6.1.2	Lista de estirpes de <i>E. coli</i>	132
6.1.3	Medios de Cultivo	132
6.1.3.1	Medio de cultivo para <i>E. coli</i>	132
6.2	Mantenimiento de estirpes de <i>C. elegans</i>	132
6.2.1	Placas NGM	132
6.2.2	Tampón M9 y tampón S	133

6.2.3	Limpieza de stocks contaminados, preparación de huevos y sincronización	133
6.2.4	Congelación de estirpes de <i>C. elegans</i>	134
6.3	Lista de primers y plásmidos	135
6.3.1	Lista de primers	135
6.3.2	Lista de plásmidos	139
6.4	Generación de transgénicos	141
6.5	Microscopía	141
6.6	Purificación de ARN total de <i>C. elegans</i>	142
6.7	Reacciones de RT-PCR	142
6.8	Expresión y purificación de proteína recombinante	142
6.9	Ensayos de actividad tiorredoxina	144
6.10	Ensayos fenotípicos de <i>C. elegans</i>	145
6.10.1	Ensayos de estrés	145
6.10.1.1	Tratamiento con arsenito de sodio	145
6.10.1.2	Tratamiento con juglona	145
6.10.1.3	Tratamiento con paraquat	146
6.10.1.4	Tratamiento con azida de sodio	146
6.10.1.5	Tratamiento de choque térmico	146
6.10.2	Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)	146
6.10.3	Ensayos de fertilidad	147
6.10.4	Análisis de apoptosis en embriones y en la línea germinal	147
6.10.5	Ensayos de longevidad	148
6.11	Ensayos de ARN de interferencia (ARNi)	149
6.12	Producción de anticuerpos anti- <i>TRXR-2</i> e inmunodetección	149
6.13	Ensayos de parálisis, inmunohistoquímica y cuantificación de depósitos β -amiloides	150
6.14	Western blot y detección de A β total	151
	Capítulo VII. Bibliografía	155

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Cuantificación de la progenie de los mutantes <i>trx-2</i> y <i>trxr-2</i> de <i>C. elegans</i>	78
Tabla 3.2 Genes silenciados por ARNi para identificar defectos sintéticos de crecimiento en mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial	79
Tabla 3.3 Cuantificación de cuerpos apoptóticos en gónadas de hermafroditas adultos silvestres y mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial	82
Tabla 3.4 Transgénicos ensayados para evaluar la inducción de estrés al silenciar los genes <i>trx-2</i> y <i>trxr-2</i> por ARNi	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Estructura de la mitocondria	3
Figura 1.2	Organización genómica del ADN mitocondrial humano	5
Figura 1.3	Esquema de la estructura y función de la cadena respiratoria	8
Figura 1.4	Cascada redox del sistema tiorredoxina	27
Figura 1.5	Esquema de un hermafrodita y de un macho adultos de <i>C. elegans</i>	35
Figura 1.6	Esquema del ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	37
Figura 1.7	Esquema de la cutícula de un nematodo adulto	38
Figura 1.8	Sistema nervioso de un hermafrodita adulto	40
Figura 1.9	Sistema alimenticio de <i>C. elegans</i>	41
Figura 1.10	Sistema reproductor de un hermafrodita adulto	41
Figura 1.11	Sistema reproductor de un macho adulto	42
Figura 1.12	Vía de señalización de la insulina/IGF en <i>C. elegans</i>	44
Figura 3.1	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TRX-2 de <i>C. elegans</i>	60
Figura 3.2	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TRXR-2 de <i>C. elegans</i>	61
Figura 3.3	Actividad enzimática de TRX-2 de <i>C. elegans</i> usando DTT como agente reductor	63
Figura 3.4	Actividad enzimática de TRX-2 de <i>C. elegans</i> usando TRXR-1 y NADPH como sistema reductor	65
Figura 3.5	Patrón de expresión transcripcional del gen <i>trx-2</i> y colocalización neuronal	67
Figura 3.6	Patrón de expresión transcripcional del gen <i>unc-32</i>	68
Figura 3.7	Patrón de expresión transcripcional del gen <i>trxr-2</i>	68
Figura 3.8	Patrón de expresión traduccional de los genes <i>trx-2</i> y <i>trxr-2</i> de <i>C. elegans</i>	70
Figura 3.9	Colocalización mitocondrial de las fusiones TRX-2::GFP y TRXR-2::GFP	71
Figura 3.10	Expresión de la secuencia MTS de los genes <i>trx-2</i> y <i>trxr-2</i> de <i>C. elegans</i>	72
Figura 3.11	Organización genómica y expresión del ARNm de <i>trx-2</i> de <i>C. elegans</i>	73
Figura 3.12	Análisis de la secuencia genómica y de aminoácidos del	

gen <i>trx-2</i> de <i>C. elegans</i>	74
Figura 3.13 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TRX-2 de <i>C. elegans</i> y de la proteína truncada que genera el alelo <i>tm2720</i>	75
Figura 3.14 Actividad enzimática de His- Δ TRX-2 de <i>C. elegans</i> usando TRXR-1/NADPH o DTT como agentes reductores	76
Figura 3.15 Organización genómica y expresión del ARNm de <i>txxr-2</i> de <i>C. elegans</i>	77
Figura 3.16 Morfología mitocondrial de mutantes simples y dobles <i>trx-2</i> y <i>txxr-2</i>	78
Figura 3.17 Cinética de apoptosis embrionaria en mutantes simples y dobles <i>trx-2</i> y <i>txxr-2</i>	82
Figura 3.18 Sensibilidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial ante distintos tratamientos de estrés oxidativo	84
Figura 3.19 Formación relativa de ERO	85
Figura 3.20 No inducción de la UPR ^{mit} ante el silenciamiento del sistema tiorredoxina mitocondrial	90
Figura 3.21 Inducción de la expresión del sistema tiorredoxina mitocondrial dependiente de la activación de la UPR ^{mit}	91
Figura 3.22 Análisis de la longevidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial	95
Figura 3.23 Análisis de la longevidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial en fondos genéticos <i>daf-16</i> y <i>daf-2</i>	96
Figura 3.24 Patrón de agregación de α -sinucleína::YFP en mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial	98
Figura 3.25 Cuantificación de la parálisis de nematodos CL2006 (<i>dvls2</i>) en ARNi de <i>trx-2</i> y de <i>txxr-2</i>	100
Figura 3.26 Cuantificación de la parálisis en nematodos CL2120 (<i>dvls14</i>) y CL2750 (<i>dvls100</i>) con fondo mutante <i>txxr-2</i> y contenido total de A β	101
Figura 3.27 Cuantificación de la parálisis de nematodos CL4176 (<i>dvls27</i>) en ARNi de <i>trx-2</i> y de <i>txxr-2</i>	102
Figura 3.28 Cuantificación de la parálisis en nematodos CL2006 (<i>dvls2</i>) y CL4176 (<i>dvls27</i>) con sobreexpresión de TRXR-2	103
Figura 3.29 Contenido total de A β de nematodos CL2006 (<i>dvls2</i>) y CL4176 (<i>dvls27</i>) con sobreexpresión de TRXR-2	105
Figura 3.30 Formación de agregados y depósitos A β	106

ABREVIATURAS

A β	Péptido β -amiloide	GSH	Glutati3n
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	H ₂ -DCF-DA	Diclorodihidrofluoresceína diacetato
ADNmt	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial	H ₂ O ₂	Per3xido de hidr3geno
ADNn	Ácido Desoxirribonucleico nuclear	KDa	Kilodaltons
ADP	Adenosín Difosfato	μ m	Micr3metros
ARN	Ácido Ribonucleico	mM	Milimolar
ARNi	Ácido Ribonucleico de interferencia	MME	Membrana Mitocondrial Externa
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal	MMI	Membrana Mitocondrial Interna
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia	MTS	Secuencia seál de entrada a mitocondria
ATP	Adenosín Trifosfato	NADH	forma reducida de Nicotinamida Adenina Dinucle3tido
°C	Grados centígrados	NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucle3tido Fosfato
CTE	Cadena transportadora de electrones	pb	Pares de bases
DTT	1,4-Ditiotreitol	Prx	Peroxisredoxina
RE	Retículo endoplásmico	TOM	Translocasa de la membrana externa, del inglés <i>Translocase of the Outer Membrane</i>
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno	Trx	Tiorredoxina
FADH ₂	forma reducida de Flavín Adenín Dinucle3tido	Trxr	Tiorredoxina reductasa
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>	UPR	Respuesta a estr3s de proteínas mal plegadas, del inglés <i>Unfolded Protein Response</i>
Grx	Glutarredoxina	YFP	Proteína amarilla fluorescente, del inglés <i>Yellow Fluorescent Protein</i>

RESUMEN

En este trabajo, se describe la caracterización del sistema tiorredoxina mitocondrial de *Caenorhabditis elegans* formado por los genes *trx-2* y *trxr-2*. Se demuestra que las proteínas TRX-2 y TRXR-2 tienen localización mitocondrial en diversas células y tejidos del nematodo y que los genes *trx-2* y *trxr-2* son inducidos cuando se activa la respuesta a estrés de proteínas mal plegadas de la mitocondria (UPR^{mit}). Sorprendentemente, los mutantes simples y dobles *trx-2* (pérdida de función) y *trxr-2* (nulos) son viables y muestran niveles similares de crecimiento con respecto a los controles silvestres. Además, la falta del sistema tiorredoxina mitocondrial en *C. elegans* no afecta a su longevidad, a su producción de especies reactivas de oxígeno ni a su programa apoptótico.

También, se describe el papel protector que ejerce TRXR-2 sobre un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer, el cual expresa el péptido humano β -amiloide en las células musculares del nematodo causando un fenotipo de parálisis progresiva dependiente de la edad. De esta manera, el silenciamiento del gen *trxr-2* provoca un aumento en el fenotipo de parálisis, mientras que un fuerte descenso en el contenido del péptido β -amiloide así como de depósitos amiloides ocurre cuando TRXR-2 es sobre-expresado.

Así, *C. elegans* provee al primer metazoo viable en un modelo *knock-out* para el sistema tiorredoxina mitocondrial e identifica un papel novedoso de este sistema en la toxicidad del péptido β -amiloide así como en la enfermedad de Alzheimer.

Lista de Publicaciones

- I. Morgan K. L., Estevez A. O., Mueller C. L., **Cacho-Valadez B.**, Miranda-Vizuite A., Szewczyk N. J., Estevez M. The glutaredoxin GLRX-21 functions to prevent selenium-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Sci.* 2010, 118 (2):530-534.

- II. Stenvall J., Fierro-González J. C., Swoboda P., Saamarthy K., Cheng Q., **Cacho-Valadez B.**, Arnér E. S., Persson O. P., Miranda-Vizuite A., Tuck S. Selenoprotein TRXR-1 and GSR-1 are essential for removal of old cuticle during molting in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)*. 2011, 108 (3):1064-1069.

- III. **Cacho-Valadez B.**, Muñoz-Lobato F., Pedrajas J., Cabello J., Fierro-González J. C., Navas P., Swoboda P., Link C., Miranda-Vizuite A. The characterization of the *Caenorhabditis elegans* mitochondrial thioredoxin system uncovers an unexpected protective role of TRXR-2 in β -amyloid peptide toxicity. *Antioxidants and Redox Signaling. PAPER ACCEPTED, IN PRESS*

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

1.1 La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo encontrado en la mayoría de las células eucariotas formada por dos membranas altamente especializadas: la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI), las cuales en conjunto forman dos compartimentos que son, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Figura 1.1) (Frey *et al.*, 2002).

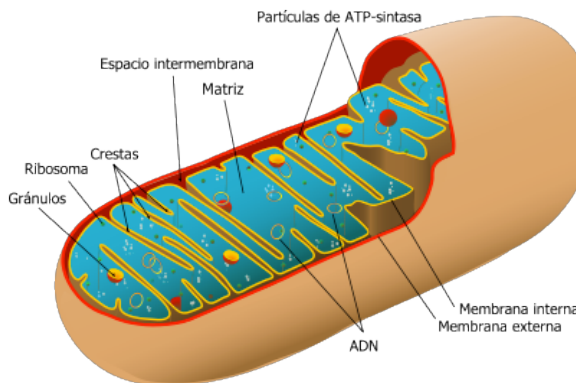


Figura 1.1 Estructura de la mitocondria. En la imagen se muestran cada uno de los componentes estructurales de la mitocondria, tales como la membrana mitocondrial externa (MME), la membrana mitocondrial interna (MMI), el espacio intermembrana, las crestas mitocondriales y la matriz.

La membrana mitocondrial externa separa a la mitocondria del citosol y es permeable para moléculas de hasta 5 KDa. Aquellas moléculas de mayor tamaño son translocadas a través de la MME mediante un complejo proteico formado por la translocasa de la membrana externa (TOM) (Bohnert *et al.*, 2007; Gebert *et al.*, 2011).

La membrana mitocondrial interna es impermeable y forma una serie de invaginaciones dentro de la matriz mitocondrial llamadas crestas, las cuales varían en número y tamaño entre los distintos tipos celulares posiblemente por la demanda de adenosín trifosfato (ATP). La membrana mitocondrial interna está formada por una bicapa lipídica que contiene en gran proporción al fosfolípido cardiolipina, el cual la hace altamente impermeable a la mayoría de las moléculas e iones (Ventura *et al.*, 2006). Embebidos en la membrana mitocondrial interna también encontramos a las proteínas que llevan a cabo las

reacciones de oxidación de la cadena respiratoria, a aquellas involucradas en la síntesis del ATP y a otras que funcionan para regular la entrada de metabolitos dentro y fuera de la matriz mitocondrial (*Alberts et al., 2008*).

El espacio intermembrana contiene enzimas que utilizan el ATP que se genera en la cadena respiratoria para fosforilar otros nucleótidos, además de iones y azúcares que difunden libremente a través de la membrana mitocondrial externa. Finalmente, la matriz mitocondrial contiene cientos de enzimas entre las que se incluyen las requeridas para realizar la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos y, aquellas necesarias para realizar el ciclo del ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs). También contiene múltiples copias de su propio ADN mitocondrial (ADNmt), ribosomas mitocondriales necesarios para la síntesis de proteínas, proteínas necesarias para la replicación mitocondrial y para la transcripción, y otras tantas enzimas requeridas para la expresión de los genes mitocondriales o necesarias para el desarrollo de distintos procesos metabólicos (*Ventura et al., 2006*).

1.2 El genoma mitocondrial

La mitocondria posee su propio genoma, el cual en humanos está formado por una molécula circular de ADN de doble cadena que contiene aproximadamente 16,500 pares de bases (Figura 1.2). El genoma mitocondrial procede de herencia materna y codifica para 37 genes entre los que se encuentran; 2 ARNr y 22 ARNt requeridos para la síntesis mitocondrial de proteínas y 13 subunidades polipeptídicas que forman parte de los complejos de la cadena respiratoria. Específicamente, codifica para siete de las 42 subunidades del complejo I, una de las 11 subunidades del complejo III, tres de las 13 subunidades del complejo IV y dos de las 14 subunidades del complejo V. Ninguna de las cuatro subunidades del complejo II son codificadas por el ADNmt. Todas las demás proteínas que conforman a los complejos de la cadena transportadora de electrones, así como todas las enzimas metabólicas, las polimerasas mitocondriales de ADN y ARN, y todos los factores de

regulación del ADN mitocondrial son codificados por genes nucleares (Anderson et al., 1981).

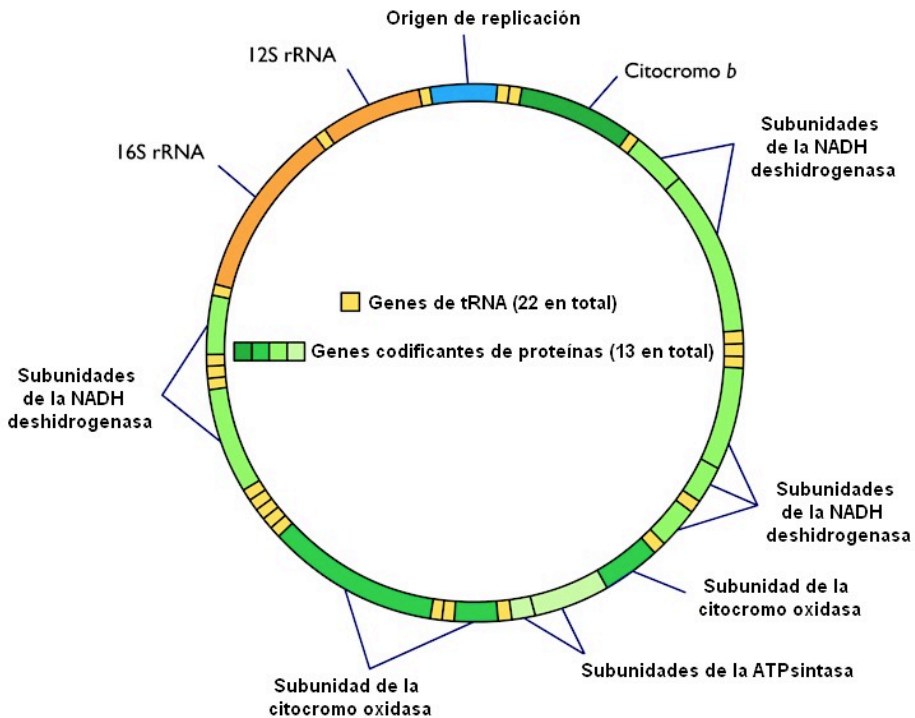


Figura 1.2 Organización genómica del ADN mitocondrial humano. En la imagen se indican los loci de los genes que codifican a las 13 proteínas que forman parte de los complejos de la cadena transportadora de electrones (en verde), también se muestra la posición de los 2 ARNr (en anaranjado) y de los 22 ARNt (en amarillo) que codifica el genoma mitocondrial, así como el origen de replicación (en azul).

Los genes mitocondriales son codificados por un código genético único que difiere parcialmente del código universal. Uno de los codones de término en el código genético universal es UGA, el cual codifica para el triptófano en la mitocondria, AUA codifica para la metionina en lugar de la isoleucina, y finalmente los codones AGA y AGG no codifican para la arginina, sino que funcionan como codones de término (Wallace, 1982).

El genoma mitocondrial es altamente compacto y no contiene intrones. Algunos de los marcos abiertos de lectura están superpuestos y, en muchos casos los codones de término no son codificados en el ADN sino que son creados post-transcripcionalmente por poliadenilación (*Anderson et al., 1981*).

El ADNmt suele mostrar una mayor frecuencia de mutaciones que el ADN nuclear (ADNn) debido a su proximidad con la cadena transportadora de electrones, la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares. Esto además, es potenciado por la ausencia de histonas protectoras y de intrones, así como por el relativamente ineficiente sistema de reparación del ADNmt en comparación con el sistema de reparación del ADNn (*Mandavilli et al., 2002*). Sin embargo, como mecanismo de protección frente a mutaciones, se ha descrito la formación de unos complejos ADN-proteína en la matriz mitocondrial, llamados nucleoides, que protegen al ADNmt contra el daño oxidativo (*Gilkinson, 2009*).

1.3 Las funciones de la mitocondria

La mitocondria está involucrada en una variedad de procesos celulares tales como; la biosíntesis del grupo hemo, la homeostasis del calcio, la diferenciación celular, el ciclo de la urea, la oxidación de ácidos grasos y metabolismo de lípidos, la homeostasis del hierro, el control del ciclo celular, la fosforilación oxidativa y la apoptosis (*Schatz, 1995*). Estos dos últimos procesos se describen con más detalle a continuación.

1.3.1 Fosforilación oxidativa

Una de las funciones principales de la mitocondria es el generar ATP, la mayor fuente de energía de todas las células eucariotas, a través de la fosforilación oxidativa. El mecanismo fundamental de generación de energía en la mitocondria es la quimiosmosis (*Mitchell, 1979*). En este proceso, la energía libre proveniente de la oxidación de los ácidos carboxílicos producida durante el ciclo del ácido cítrico, en forma de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y

de flavina adenina dinucleótido (FADH_2), es usada para bombear protones fuera de la matriz mitocondrial para generar un gradiente electroquímico en el espacio intermembrana de la mitocondria. Posteriormente, una enzima denominada ATP sintasa realiza el transporte de estos protones de regreso a la matriz, a través de la membrana mitocondrial interna, con la subsecuente fosforilación del ADP para producir ATP (*DiMauro y Schon, 2003*).

Las proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa incluyen a cuatro complejos enzimáticos que en conjunto se denominan cadena transportadora de electrones (CTE), una ATP sintasa o complejo V y el translocador adenina nucleótido. La cadena transportadora de electrones oxida al NADH o al FADH_2 , generados durante el ciclo del ácido tricarboxílico, empleando al O_2 como aceptor final de electrones para generar agua y producir ATP. Específicamente, los electrones del NADH son transferidos al complejo respiratorio I (NADH deshidrogenasa) y después hacia la ubiquinona (coenzima Q), mientras que los electrones del succinato (provenientes del ciclo del ácido tricarboxílico o desde la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) son transferidos al complejo II (succinato deshidrogenasa) y después hacia la ubiquinona. Desde la ubiquinona, los electrones son subsecuentemente transferidos al complejo III (citocromo bc_1) y después al citocromo c, al complejo IV (citocromo c oxidasa) y finalmente al oxígeno molecular para generar H_2O (Figura 1.3) (*Lanza y Nair, 2009; Alberts et al., 2008*).

La energía creada por esta transferencia de electrones es usada para bombear protones hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico que representa la fuerza para el transporte de regreso de los protones hacia la matriz, llevando a la condensación catalítica de la adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) por la ATP sintasa, para generar ATP. Finalmente el ATP es exportado hacia el citosol por la adenina nucleótido translocasa como intercambio del gasto de ADP (*Wallace, 1999*).

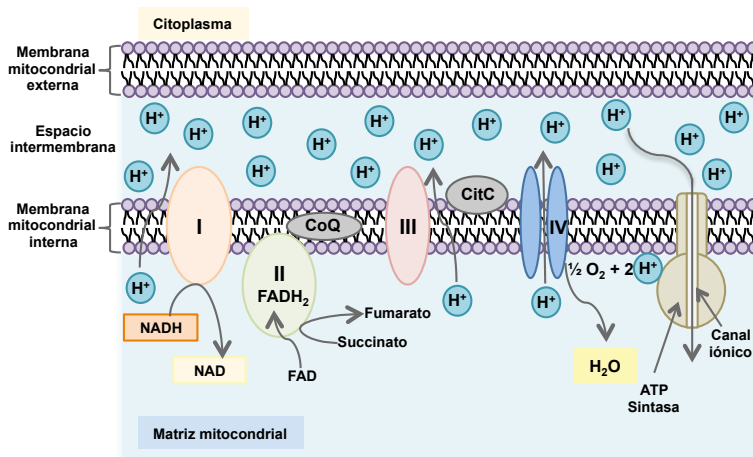


Figura 1.3 Esquema de la estructura y función de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria está formada por cinco complejos enzimáticos distintos (complejos I - V), por la ubiquinona o coenzima Q (CoQ) y por el citocromo c (CitC). Los electrones provenientes de la oxidación del NADH, del $FADH_2$ y del succinato por los complejos I y II son transferidos hacia el CoQ, luego al complejo III, al citocromo C y al complejo IV, donde finalmente reaccionan con el oxígeno molecular ($\frac{1}{2}O_2$) para formar agua (H_2O). Mientras los electrones son transferidos, los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana para formar un gradiente electroquímico que será posteriormente utilizado para sintetizar ATP.

La cadena transportadora de electrones consume más del 90% del oxígeno incorporado por la célula y de éste, se calcula que aproximadamente el 3%, es convertido a especies reactivas de oxígeno (Staniek y Nohl, 2000).

1.3.2 Apoptosis

La muerte celular programada, o apoptosis, desempeña un papel fundamental en la eliminación de células infectadas o dañadas en todos los organismos multicelulares así como en diversos procesos biológicos entre los que se incluye el desarrollo, la diferenciación celular y la proliferación (Adams, 2003). La apoptosis es una forma altamente controlada de muerte celular, por lo que la desregulación de ésta deriva a condiciones patológicas como el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas (Thompson, 1995).

La apoptosis puede ser inducida por una variedad de estímulos fisiológicos y patofisiológicos; por ejemplo, por moléculas receptoras CD95 (*Schütze et al., 2008*), por el factor de necrosis tumoral (TNF α) (*Ashkenazi, 2002*), por factores de crecimiento (*Letai, 2006*), por luz ultravioleta (*Zhang et al., 2009*), por irradiación (*Stevenson et al., 1994*), por choque térmico (*Dudeja et al., 2009*), por drogas citotóxicas (*Solary et al., 2000*), por estrés oxidativo (*Meng y Yu, 2010*) y por bacterias (*Lancellotti et al., 2009*), entre otros.

Hasta el momento, se han identificado a dos rutas principales de señalización de la apoptosis; la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca involucra a receptores de muerte celulares y la vía intrínseca involucra a la señalización mitocondrial (*Scaffidi et al., 1998*).

La vía extrínseca de la apoptosis se inicia con la unión entre los receptores transmembranales (FAS, TNFR1 y TRAIL-R1), pertenecientes a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), con sus respectivos ligandos extracelulares (FASL, TNF α y TRAIL) (*Ashkenazi, 2002; Locksley et al., 2001; Wajant, 2002*). Ante esta asociación, los receptores trimerizan y posteriormente interactúan con la proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*). Tal interacción lleva a la formación del complejo DISC (*death-inducing signaling complex*), el cual reclutará a varias procaspasas-8 para que con su agregación se promueva su autoactivación (*Berg et al., 2007; Huang et al., 2007; Lee et al., 2006*). La caspasa-8 activada tiene dos opciones; activar a las caspasas efectoras 3 y 7 para acelerar la cascada de caspasas, o cortar a la proteína pro-apoptótica Bid para que subsecuentemente su forma truncada (tBid) transloque a la mitocondria y de inicio a la vía intrínseca de la apoptosis (*Barnhart et al., 2003; Li et al., 1998*).

En la vía intrínseca, también conocida como vía mitocondrial, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa es el evento crucial para iniciar la apoptosis al dar lugar a la liberación de proteínas apoptóticas tales

como el citocromo *c*, Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase*), HtrA2/Omi (*high temperature requirement protein 2*), el factor de inducción de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (Tait y Green, 2010).

La vía mitocondrial de la apoptosis en mamíferos es principalmente regulada por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Ola et al., 2011). Las proteínas de la familia Bcl-2 tienen actividades pro- y anti-apoptóticas, y un ligero cambio en el balance dinámico de estas proteínas puede resultar en la inhibición, o en la promoción de la muerte celular. Así, en respuesta a diversos estímulos apoptóticos, ciertos miembros de la familia Bcl-2, conocidos como proteínas BH3 son activados. La activación de las proteínas BH3 causa la posterior activación de las proteínas pro-apoptóticas Bax (*Bcl-2-associated X protein*) y Bak (*Bcl-2 antagonist/killer-1*) en la mitocondria. Cuando Bax y Bak son activados, homo-oligomerizan y participan en la formación de poros en la membrana mitocondrial externa a través de los cuales las moléculas pro-apoptóticas escapan para realizar los eventos de señalización citosólicos dependientes o independientes de caspasas (Borutaite, 2010).

En la vía de señalización dependiente de caspasas, el citocromo *c* liberado desde la mitocondria interactúa con la proteína APAF1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*) para inducir su cambio conformacional, causar su oligomerización y formar la plataforma de activación de caspasas denominada apoptosoma (Li et al., 1997). El apoptosoma recluta, dimeriza y activa a una caspasa de iniciación, la caspasa 9, la cual a su vez activará a las caspasas efectoras 3 y 7 (Yang et al., 1997).

La liberación desde la mitocondria de Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, favorece al mecanismo de activación de caspasas bloqueando y secuestrando respectivamente a las proteínas inhibitorias de la apoptosis o IAP's (Van Gurp et al., 2003). Una vez ocurrida la activación de las caspasas efectoras 3 y 7,

comienzan a generarse los cambios morfológicos característicos de la apoptosis como son; la degradación del ADN, la condensación de la cromatina, la reducción del volumen celular, la exposición de fosfatidilserina hacia la parte externa de la membrana plasmática y la desintegración de la mitocondria (*Gulbins et al., 2000; Saikumar et al., 1999*).

Por otro lado, el factor de inducción de apoptosis 1 (AIF-1) y la endonucleasa G, translocan desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el núcleo, causando la condensación de la cromatina a gran escala así como la fragmentación del ADN para promover la muerte celular independiente de la activación de caspasas (*Comelli et al., 2009; Susin et al., 1999*).

1.4 Enfermedades humanas asociadas a desórdenes mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales son trastornos provocados por mutaciones presentes tanto en el ADNmt como en genes nucleares que codifican a proteínas de localización mitocondrial, que afectan principalmente al funcionamiento adecuado de la cadena transportadora de electrones. Las enfermedades mitocondriales se caracterizan por presentar un amplio espectro de síntomas y manifestaciones clínicas, llegando a comprometer desde un solo órgano o tejido, hasta presentar desórdenes multisistémicos (*McFarland, 2002*).

A la mayoría de los desórdenes relacionados con la disfunción mitocondrial que presentan signos y síntomas de neurodegeneración, miopatía y defectos cardíacos se les denomina genéricamente encefalocardiomiopatías. Sin embargo, el fenotipo de las enfermedades mitocondriales puede ser muy complejo, ya que la misma mutación puede producir fenotipos muy distintos y mutaciones diferentes pueden producir fenotipos similares. Es por esto, que los desórdenes mitocondriales son clasificados por defecto genético y no por manifestaciones clínicas (*DiMauro y Hirano, 2005*).

La variabilidad, en cuanto a la presentación clínica en las enfermedades mitocondriales, puede ser explicada en parte por las características especiales que presenta la genética del ADNmt: la herencia materna, la heteroplasmia y la segregación mitótica (*DiMauro y Schon, 2003*). En cuanto a la herencia materna, se sabe que todas las mitocondrias en el cigoto provienen del óvulo. Es por esto, que una madre que posee una mutación en el ADNmt la transmitirá a todos sus hijos, y únicamente sus hijas la transferirán a su progenie (*Giles et al., 1980*). Debido a que existen cientos de moléculas de ADNmt en cada célula, y en general, las mutaciones patogénicas del ADNmt están presentes en algunos pero no en todos estos genomas, se tienen como resultado células y tejidos que poseen una mezcla de ADNmt normal y mutado, situación conocida como heteroplasmia (*Stoneking, 1996*). En sujetos normales, todos los ADNmt son idénticos (homoplasmia). Un número mínimo de ADNmt mutados deberán de estar presentes en las células o tejidos antes de que ocurra alguna disfunción mitocondrial y los signos clínicos comiencen a ser aparentes, a este fenómeno se le denomina el efecto umbral. El umbral para alguna enfermedad es menor en tejidos que son altamente dependientes del metabolismo oxidativo, tales como el cerebro, el corazón, el músculo esquelético, la retina, los túbulos renales y las glándulas endócrinas, por lo cual, estos tejidos serán especialmente vulnerables a los efectos de las mutaciones patogénicas en el ADNmt (*DiMauro y Davidzon, 2005*).

1.4.1 Desórdenes mitocondriales adscritos a mutaciones en el ADNmt

Las enfermedades asociadas a mutaciones en el ADNmt se clasifican en función del tipo de mutación: (1) las mutaciones que involucran a grandes deleciones en el ADNmt y (2) las mutaciones puntuales (*DiMauro y Schon, 2003*). Las grandes deleciones en el ADNmt, por lo general de 1 a 10 kb, dan lugar a patologías tales como la Oftalmoplejía Progresiva Crónica (CPEO), el síndrome de Kearns-Sayre (KSS) y el síndrome de Pearson. La CPEO se desarrolla con una oftalmoplejía progresiva externa tardía, con miopatía

proximal e intolerancia al ejercicio (*Wallace, 1999*). Las características clínicas principales del síndrome KSS por lo general hacen su aparición antes de los 20 años de edad desarrollando oftalmoplejía progresiva externa, retinopatía pigmentaria y defectos en el funcionamiento cardíaco (*Young et al., 2005*). El síndrome de Pearson se caracteriza por causar anemia sideroblástica y disfunción exocrina del páncreas principalmente durante la infancia (*McShane et al., 1991*). Los pocos pacientes que sobreviven a la infancia temprana, o hasta la edad adulta, por lo general desarrollan el síndrome de KSS con oftalmoplejía, ataxia, retinitis pigmentaria, defectos de conducción cardíaca y miopatía (*Larsson et al., 1990*).

Las enfermedades causadas por mutaciones puntuales, usualmente afectan a los genes que codifican a los complejos de la cadena respiratoria, o a genes que codifican a los ARNt mitocondriales. Las mutaciones puntuales más frecuentes en genes de la cadena respiratoria incluyen a algunas que afectan a las subunidades del complejo I, causando la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) (*McFarland et al., 2007*) y, a otras que afectan a la subunidad 6 del complejo V (ATP6) causando debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP) (*Holt et al., 1990*) si la mutación está presente en un porcentaje menor al 75% en el ADNmt o, causando el síndrome de Leigh, un desorden neurológico fatal de la infancia, si la mutación está presente en más del 95% del ADNmt (*Santorelli et al., 1993*). Las mutaciones más comunes de los ARNt son aquellas que afectan al gen ARNt^{Lys} que provoca epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (MERRF) (*Shoffner et al., 1990*) y, aquellas mutaciones en el gen ARNt^{Leu(UUR)} asociado generalmente con la encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de ictus (MELAS) (*Goto et al., 1990*).

1.4.2 Desórdenes mitocondriales adscritos a mutaciones en genes nucleares que codifican a proteínas con localización mitocondrial

Estas enfermedades pueden ser subdivididas en tres clases distintas: (1) aquellas que son causadas por mutaciones que afectan a los componentes estructurales de la cadena respiratoria, (2) aquellas que afectan el importe y ensamblaje de proteínas mitocondriales y (3) aquellas que afectan la estabilidad, integridad o mantenimiento del ADNmt. La primera clase de mutaciones, que afectan a los componentes de la cadena respiratoria, se han encontrado con mayor frecuencia en genes que codifican para los complejos I y II, y se han asociado con el síndrome de Leigh (*Zeviani y Carelli, 2007*). Este síndrome, también puede ser causado por mutaciones en los genes *SURF1*, *SCO1* y *SCO2*, los cuales pertenecen a la segunda clase de mutaciones que afectan al correcto ensamblaje de proteínas mitocondriales, en este caso del complejo IV (*Tiranti et al., 1998*). Otras enfermedades que se dan lugar por defectos en el importe y ensamblaje de proteínas mitocondriales son la Ataxia de Friedreich, un desorden neurológico causado por mutaciones en el gen frataxina *FRDA* (*Delatycki et al., 2000*); la enfermedad de Wilson, causada por una mutación en el gen *ATP7B* que normalmente codifica a una ATPasa transportadora de cobre (*Pfeiffer, 2007*); el síndrome de Mohr-Tranebjaerg o síndrome de la sordera-distonía, que resulta de mutaciones en *TIMM8* que normalmente codifica la proteína DDP1, un componente de la maquinaria de importe mitocondrial (*Blesa et al., 2007*); y finalmente la paraplejia espástica hereditaria, que ocurre por mutaciones causadas en la proteína mitocondrial paraplejina SPG7 (*Carelli et al., 2009*).

Desórdenes asociados a la estabilidad del ADNmt son causados por mutaciones en genes tales como *Twinkle*, una helicasa del ADNmt (*Spelbrink et al., 2001*); *POLG*, la polimerasa gamma del ADNmt (*Hirano y DiMauro, 2001*; *Van Goethem et al., 2001*), y *ANT1*, un translocador de adenina nucleótido específico de músculo esquelético (*Kaukonen et al., 2000*). Estas mutaciones

generalmente provocan oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante (adPEO) con características clínicas de intolerancia al ejercicio y ptosis. Además, mutaciones en los genes timidina quinasa 2 (*TK2*) y deoxoguanosina quinasa (involucrado en el metabolismo de los dNTP's) se han asociado con el síndrome del agotamiento del ADN mitocondrial (MDS), caracterizado por la reducción en el número de copias del ADNmt que conlleva a la aparición de hepatopatías o miopatías congénitas fatales en la infancia (*Freisinger et al., 2006; Saada et al., 2001*)

1.4.3 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas están asociadas con la muerte neuronal y con la pérdida progresiva de la sinapsis en zonas vulnerables del cerebro y de la médula espinal. Estas enfermedades son consecuencia de mutaciones genéticas no mitocondriales y están fuertemente relacionadas con la edad (*Jellinger, 2009; Mandemakers et al., 2007*).

Tras varias décadas de estudio, se ha evidenciado que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo juegan un papel importante en el desarrollo de desórdenes neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington entre otras (*Enns, 2003; Jellinger, 2009; Mandemakers et al., 2007; Sas et al., 2007*).

Debido a que las neuronas son células metabólicamente muy activas y a que poseen una elevada demanda energética, resultan mucho más sensibles y vulnerables que otras células a la disfunción mitocondrial (*Han et al., 2011*).

1.4.3.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la más común de los desórdenes neurodegenerativos asociados con la edad y es la responsable de la mayoría de los casos de demencia senil (*Cotter, 2007; Ott et al., 1995*). Este deterioro cognitivo es el resultado de la pérdida neuronal progresiva en el hipocampo y

en la corteza, a lo cual se añaden dos lesiones cerebrales: la acumulación de placas seniles compuestas por el péptido β -amiloide ($A\beta$) y la presencia de ovillos neurofibrilares formados por la proteína hiperfosforilada tau (*Schon y Manfredi, 2003*).

Genéticamente, la enfermedad de Alzheimer puede ser clasificada como familiar o esporádica. Las formas familiares de Alzheimer por lo general ocurren antes de los 60-65 años de edad y forman parte de menos del 2% de todos los casos de la enfermedad (*Jakob-Roetne y Jacobsen, 2009*). Estas formas autosómicas dominantes son causadas por mutaciones en tres genes relacionados con la proteólisis del péptido- $A\beta$: *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. *APP* codifica a la proteína precursora del amiloide, la cual después de rupturas secuenciales realizadas por las β - y γ -secretasas, genera al péptido- $A\beta$. *PSEN1* y *PSEN2* codifican a los polipéptidos presenilina 1 (PS1) y presenilina 2 (PS2) respectivamente, donde ambos forman parte del complejo de la γ -secretasa (*Bertram y Tanzi, 2008; Moreira et al., 2006*). Mutaciones en estos genes llevan a la acumulación intraneuronal y extracelular del péptido- $A\beta_{1-42}$ dando como resultado una amiloidosis temprana del cerebro. El péptido- $A\beta_{1-42}$ es la forma larga de $A\beta$ y es considerada más tóxica que la forma corta $A\beta_{1-40}$ (*Burdick et al., 1992*). La deposición de $A\beta$ es la base de la hipótesis amiloide (*Hardy y Higgins, 1992*), la cual sugiere que la formación de placas amiloides es el primer evento patológico de la enfermedad de Alzheimer que desencadena una cascada de respuestas inflamatorias, de daño oxidativo y de disfunción sináptica con déficits de neurotransmisores, que desembocan finalmente en demencia. En este sentido, la disfunción mitocondrial sería una consecuencia secundaria.

La hipótesis amiloide, no puede ser aplicada a la forma esporádica de Alzheimer, porque pacientes con este tipo común de enfermedad no presentan mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. La forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer es causada por factores endógenos o ambientales y

se manifiestan de forma tardía en la edad (*Baloyannis, 2004; Bertram y Tanzi, 2008*). En 2004, *Swerdlow y Khan (2004)* propusieron que la forma esporádica de Alzheimer no es causada por la acumulación de A β , en su lugar, es una consecuencia de la disminución de las funciones mitocondriales conforme se envejece. Estas mitocondrias dañadas con el tiempo alcanzan un umbral funcional que desencadena algunos eventos tales como la deposición de A β , la pérdida sináptica, la degeneración y la formación de los ovillos neurofibrilares (*Moreira et al., 2006; Swerdlow y Khan, 2009*).

Algunos estudios han sugerido que el péptido A β puede contribuir a la disfunción mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer. APP tiene una secuencia señal de entrada a mitocondria que dirige al péptido hacia la mitocondria, pero su incompleta translocación y acumulación en la membrana mitocondrial interna provoca una disfunción oxidativa (*Anandatheerthavarada et al., 2003*). Como se mencionó anteriormente, APP es fragmentada por la acción del complejo β - y γ -secretasa, que de igual manera ha sido identificado en la mitocondria (*Ankarcrona y Hultenby, 2002*). A β puede interactuar directamente con la alcohol deshidrogenasa, promoviendo la liberación del citocromo c y aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (*Lustbader et al., 2004*). A β también puede interactuar con la ciclofilina D (CypD), una peptidilprolil isomerasa F residente en la matriz mitocondrial que se asocia a la membrana mitocondrial interna durante la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP). Tal interacción A β -CypD, aumenta la acumulación y producción de especies reactivas de oxígeno, disminuye el potencial de membrana mitocondrial y eventualmente provoca la muerte celular (*Du et al., 2008*).

También, se ha demostrado que la sobreexpresión de A β causa una alteración en las proteínas de fusión y fisión mitocondrial. Wang y colaboradores (*Wang et al., 2008*), observaron que tras sobreexpresar A β se genera un descenso de

DLP1 y OPA1, un incremento de Fis1 y ninguna alteración en los niveles de Mfn1 y Mfn2. Las proteínas DLP1 y Fis1 son requeridas para la fisión mitocondrial, mientras que OPA1, Mfn1 y Mfn2 son requeridas para la fusión mitocondrial. El desequilibrio entre las proteínas de fusión y fisión resulta en disfunción y fragmentación mitocondrial, en una elevada producción de ROS y de ATP y en una disminución del potencial de membrana mitocondrial.

1.4.3.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es el segundo desorden neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer (*George et al., 2009; Naoi et al., 2009*). Patológicamente, es caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta así como por la acumulación de inclusiones intraneuronales llamados cuerpos de Lewy en las neuronas sobrevivientes. Pacientes con la enfermedad de Parkinson muestran temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural, además de síntomas no motores como depresión y problemas cognitivos y autonómicos (*Hardy et al., 2007*).

La conexión mitocondrial con la enfermedad de Parkinson comenzó cuando se descubrió que el compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) causaba parkinsonismo en humanos y en animales de laboratorio (*Langston et al., 1983*). MPTP inhibe al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y promueve la liberación del citocromo c desde la membrana mitocondrial interna (*Banerjee et al., 2009; Perier et al., 2005*). Más tarde, se encontraron deficiencias en el complejo I y daños oxidativos en la sustancia negra del cerebro de los pacientes de Parkinson, así como una inmunoreactividad reducida para las subunidades del complejo I en neuronas afectadas.

Aproximadamente una décima parte de todos los casos de Parkinson pueden ser seguidos por mutaciones dominantes y recesivas en genes que codifican a la α -sinucleína y a la parkina, ambos, componentes de los cuerpos de Lewy

(Choi *et al.*, 2001). La α -sinucleína tiene una tendencia natural para formar agregados y las mutaciones en el gen que la codifica (*SNCA*) aumentan tal característica (Gasser, 2009). La α -sinucleína mutada suele acumularse en la membrana mitocondrial externa y puede causar deficiencias en el funcionamiento del complejo I, provocando el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno que posiblemente induzcan la muerte celular (Devi *et al.*, 2008).

La *Parkina* (*PARK2*), *PINK1* y *DJ-1/PARK7* son genes relacionados con la enfermedad de Parkinson que codifican a proteínas crucialmente involucradas con el funcionamiento mitocondrial y con la resistencia al estrés oxidativo. La *Parkina*, codifica a una E3 ubiquitina ligasa que participa en el marcaje de proteínas con ubiquitina para su degradación por el proteasoma. Mutaciones en la *Parkina* se han encontrado en casos de parkinsonismo juvenil recesivo (Kitada *et al.*, 1998). La *Parkina* se asocia a la membrana mitocondrial externa y se ha sugerido que juega un papel importante en la morfología mitocondrial (Poole *et al.*, 2008) y en la actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria (Müftüoglu *et al.*, 2004; Palacino *et al.*, 2004).

PINK1 es una serina/treonina quinasa localizada en la membrana mitocondrial interna (Silvestri *et al.*, 2005) y se cree que es una molécula neuroprotectora contra la apoptosis (Petit *et al.*, 2005). Mutaciones en *PINK1* causan descenso en la actividad del complejo I así como un aumento en el daño oxidativo (Henchcliffe y Beal, 2008). El silenciamiento de *PINK1* induce además la fragmentación mitocondrial, la autofagia y una homeostasis desregulada del calcio (Dagda *et al.*, 2009; Gandhi *et al.*, 2009).

La proteína DJ-1 es codificada por *PARK7* y es responsable de dar protección a las neuronas en contra del estrés oxidativo (Winklhofer y Haass, 2010). Omi/HTRA2 es una serina proteasa localizada en el espacio intermembrana mitocondrial, codificada por el gen *PARK13* e involucrada generalmente en la

regulación de vías apoptóticas (*Van Gurp et al., 2003*). Además de estar asociada con la enfermedad de Parkinson por haberse encontrado mutaciones de pérdida de función en algunos pacientes con este desorden (*Strauss et al., 2005*), Omi/HTRA2 también está relacionada con la enfermedad de Alzheimer, ya que puede interactuar con la presenilina-1 y con el péptido A β (*Gray et al., 2000; Park et al., 2004*).

1.4.4 La calidad mitocondrial y el envejecimiento

El envejecimiento es un proceso natural definido como el deterioro progresivo de las funciones biológicas del organismo, generalmente acompañado de un descenso en la fertilidad, que tiene como resultado el aumento de la vulnerabilidad ante factores ambientales así como un riesgo creciente para la aparición de enfermedades asociadas con la edad (*Kirkwood y Austad, 2000*).

Se han propuesto algunas teorías que explican los procesos que causan el envejecimiento debido a que su origen exacto a nivel molecular aún permanece desconocido, una de ellas es 'la teoría del envejecimiento por radicales libres' o 'la teoría mitocondrial del envejecimiento' propuesta en el año 1956 por Denham Harman. Esta teoría postula que, la acumulación celular de macromoléculas dañadas por los radicales libres de oxígeno, formados de manera endógena por los procesos metabólicos normales, son la causa del envejecimiento (*Harman, 1956*).

De acuerdo a esta teoría, los radicales libres de oxígeno dañan al ADNmt, causando mutaciones que se acumulan a lo largo de la edad. Durante la respiración aeróbica normal, las especies reactivas de oxígeno son generadas en pequeñas cantidades y son eliminadas por enzimas o moléculas antioxidantes. Sin embargo, en tejidos viejos, la producción de radicales libres es mayor y la capacidad de las enzimas antioxidantes decae, resultando en una elevada producción de radicales libres que podrían causar daño oxidativo a los distintos componentes celulares, incluyendo al ADNmt. La acumulación

progresiva de dichos daños provocará un mal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y generará una mayor producción de especies reactivas de oxígeno con la consecuente acumulación adicional de mutaciones al ADNmt (*Harman, 1972*). Este círculo vicioso propone que el aumento exponencial de las mutaciones causadas en el ADNmt con el tiempo resultarán en envejecimiento, degeneración y muerte celular.

Los cambios relacionados con la edad, en contenido y funcionamiento mitocondrial, están bien documentados. Por microscopía electrónica se ha demostrado que la densidad del volumen mitocondrial disminuye con la edad en el músculo esquelético (*Conley et al., 2000*). Y también, que las delecciones y mutaciones puntuales en el ADNmt se acumulan con la edad en humanos (*Cao et al., 2007; Corral-Debrinski et al., 1992; Cortopassi et al., 1992*), primates (*Schwarze et al., 1995*) y roedores (*Khaidakov et al., 2003*).

Algunos modelos genéticos se han desarrollado para estudiar el efecto de las especies reactivas de oxígeno en el funcionamiento mitocondrial. Un modelo en ratones con una ADN polimerasa gamma (POLG) deficiente y de baja fidelidad, demostró que debido a la acumulación de mutaciones puntuales en el ADNmt de estos roedores existen características prematuras del envejecimiento tales como la pérdida de peso, grasa subcutánea reducida, alopecia, osteoporosis, anemia, fertilidad reducida, sarcopenia, pérdida progresiva del oído y enfermedades del corazón (*Trifunovic et al., 2005*); sin embargo, este estudio no prueba que los niveles de mutaciones presentes en el ADNmt durante el envejecimiento normal son suficientes para causar tales fenotipos en humanos.

Por otro lado, la única intervención capaz de extender la longevidad en la mayor parte de los modelos animales es la restricción calórica (*Lanza y Nair, 2009*), la cual disminuye el daño al ADNmt así como la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad en roedores (*Masoro, 2000*). Al igual que la restricción calórica, la actividad física y el ejercicio son estímulos fuertes

que aumentan el contenido y las funciones mitocondriales (*Handschin y Spiegelman, 2008*). La actividad física reduce el decaimiento de las funciones cerebrales y musculares relacionadas con la edad. Individuos que tienen una mayor actividad física muestran menores incidencias en desarrollar enfermedades concomitantes con la edad así como una reducción de la mortalidad (*Manini, 2010; Manini et al., 2006*) y un mejor control de las enfermedades crónicas existentes. Además, la resistencia al ejercicio previene la aparición prematura de características del envejecimiento en ratones con POLG deficiente (*Safdar et al., 2011*). Contrariamente, la inactividad física lleva a una reducción en el contenido y en las funciones mitocondriales (*Lanza y Nair, 2010; Safdar et al., 2010*) y además, contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina (estado pre-diabético) (*Krogh-Madsen et al., 2010*).

1.5 Formación de especies reactivas de oxígeno

La mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares provienen de la respiración mitocondrial normal (*Ambrosio et al., 1993*), donde la formación del radical superóxido (O_2^-) surge como consecuencia del escape de electrones desde los complejos I y III de la cadena respiratoria (*Balaban et al., 2005*).

La formación del radical superóxido a partir de la reducción de un electrón del oxígeno molecular inicia la producción de una variedad de compuestos citotóxicos conocidos como ERO, entre los que se incluye el radical hidroxilo (OH^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxinitrito ($ONOO^-$), el malonaldehído, el 4-hidroxinonenal, etc., (*Ambrosio et al., 1993*).

La mitocondria es la responsable de generar la mayor parte de las ERO celulares (1-2%) (*Boveris, 1977; St-Pierre, Buckingham et al., 2002*), aunque éstas también suelen ser producidas en menor cantidad por las ciclooxigenasas, por las NADPH oxidasas y por los peroxisomas (*Circu y Aw, 2010*). Las ERO generadas continuamente en la célula, forman parte de las

vías de señalización celular que regulan la producción de energía y la proliferación celular (*Dada et al., 2003; Nemoto et al., 2000; Wallace, 2005*); sin embargo, a elevadas concentraciones resultan tóxicas y provocan daños a las proteínas, a los lípidos y al ADN celular, generando una discapacidad funcional que puede provocar la inducción de la apoptosis.

1.5.1 Daño causado por especies reactivas de oxígeno

Debido a que las ERO son altamente reactivas, son muy propensas a causar daños celulares que pueden ser potencialmente tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos. Las ERO son capaces de dañar a cada uno de los bloques que conforman a la célula, incluyendo al ADN, a los lípidos y a las proteínas (*Finkel y Holbrook, 2000*).

Dentro de las proteínas, aquellas que contienen azufre en su estructura en forma de cisteína o metionina, resultan más vulnerables a modificaciones oxidativas (*Davies, 2005*). La metionina se oxida fácilmente a metionina sulfóxido (-SO) o a metionina sulfona (-SOO); y el grupo tiol de las cisteínas es oxidado a ácido sulfénico (-SOH), que debido a su naturaleza inestable puede ser posteriormente oxidado a ácido sulfinico (-SO₂H) o a ácido sulfónico (-SO₃H), e incluso es capaz de formar enlaces disulfuro reversibles (-S-S-) con los residuos de cisteína cercanos. Los aminoácidos arginina, lisina, prolina y treonina son más propensos a la carbonilación, es decir, a la introducción de moléculas de monóxido de carbono en su estructura que por lo general marca a las proteínas para su degradación por proteólisis; sin embargo, tales proteínas pueden escapar de la degradación y formar agregados de alto peso molecular que se acumulan con la edad y que pueden ser los precursores del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (*Nyström, 2005*).

El daño oxidativo al ADN puede provocar la ruptura de la doble cadena así como la modificación de las bases nitrogenadas o de la desoxirribosa (*Cooke et al., 2003*). De entre todas las lesiones que sufre el ADN por oxidación la más

común es la formación de la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, la cual suele ser un biomarcador de estrés oxidativo (*Shigenaga y Ames, 1991*). La modificación oxidativa de lípidos incluye a la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados procedentes principalmente de las membranas celulares (*Gardner, 1989*).

Considerando los numerosos puntos de ataque celulares, no es de sorprenderse que el daño oxidativo interfiera con muchas funciones básicas de la célula tales como la replicación del ADN, la división celular, la integridad de las membranas y la señalización celular (*Davies, 2000*).

1.6 Sistemas antioxidantes

Para limitar el daño causado por las especies reactivas de oxígeno, las células han desarrollado un gran número de defensas antioxidantes encargadas de realizar su detoxificación. Las defensas antioxidantes pueden estar conformadas por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

Los sistemas enzimáticos eliminan a las ERO catalíticamente; por ejemplo, el radical superóxido O_2^- es convertido a peróxido de hidrógeno por la manganoso superóxido dismutasa (MnSOD, presente en la matriz mitocondrial) o por la superóxido dismutasa dimérica Cu/Zn (Cu/ZnSOD) presente tanto en el citosol como en el espacio extracelular (*Fridovich, 1995; Fridovich, 1997*). Posteriormente, el H_2O_2 generado es convertido a agua por las catalasas presentes en el citosol, o por la glutatión peroxidasa (GPx) y las peroxirredoxinas (Prx), de las que existen distintas isoformas en varios compartimentos subcelulares (*Rhee et al., 1994*). Las catalasas directamente descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular (*Chelikani et al., 2004*), mientras que las peroxirredoxinas eliminan al peróxido de hidrógeno utilizando los residuos cisteína presentes en su sitio activo (*Chae et al., 1999; Hall et al., 2009*). Las glutatión peroxidasas catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno a agua usando una molécula de glutatión reducido (GSH) como donadora de electrones (*Mari et al., 2009; Ursini et al., 1995*). Y,

en presencia de cationes divalentes de Fe^{2+} y Cu^{2+} , el peróxido de hidrógeno es dismutado a través de la reacción de Fenton para producir radicales hidroxilo OH^\cdot (*Fridovich, 1995*).

Además de la presencia de enzimas antioxidantes, las células también contienen otras moléculas no enzimáticas que protegen a la célula contra los daños causados por ERO. Por ejemplo, la vitamina E es una molécula liposoluble que protege a las membranas celulares del daño oxidativo; la vitamina C, es un antioxidante hidrosoluble que protege contra la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas; y los carotenoides y la vitamina A, suelen proteger del daño foto inducido (*Jones, 2008*).

Una de las moléculas antioxidantes no enzimáticas más importantes y abundantes (1-15mM en citosol) es el glutatión (GSH), un tripéptido compuesto por una molécula de glutamato, una cisteína y una glicina. Gracias a la presencia del residuo de cisteína en su estructura, el glutatión es esencial en la regulación de la formación de enlaces disulfuro de las proteínas y en la eliminación de agentes oxidantes. La función antioxidante del GSH es mediada por reacciones de conjugación catalizadas por la glutatión S-transferasa (*Armstrong, 1997*), o bien es directa como en el caso de la reducción del peróxido de hidrógeno por las glutatión peroxidasas (*Mari et al., 2009*).

Otra clase de sistemas antioxidantes íntimamente relacionados con el GSH son las glutarredoxinas (Grx), las cuales reducen a las proteínas S-glutationiladas y a los ácidos sulfénicos formados por la oxidación del grupo tiol de los residuos de cisteína presentes en algunos polipéptidos. Las glutarredoxinas poseen funciones parcialmente similares a las tioredoxinas (Trx) las cuales reducen de manera eficaz a los enlaces disulfuro inter e intramoleculares así como también a los ácidos sulfénicos (*Holmgren, 2000*). Debido a que algunas de las enzimas antioxidantes mencionadas anteriormente interactúan y convergen con el sistema tioredoxina, sus funciones serán detalladas en el siguiente apartado.

1.6.1 El sistema tioredoxina

El sistema tioredoxina está formado por la tioredoxina (Trx) y la tioredoxina reductasa (TrxR), la cual cataliza la reducción del sitio activo disulfuro de la Trx usando al NADPH como donador de electrones. El sistema tioredoxina, además de participar en el control redox celular, desarrolla algunas funciones dentro de los procesos de regulación de la proliferación y de la muerte celular entre otras tantas que serán descritas a continuación (Arnér y Holmgren, 2000; Nordberg y Arnér, 2001; Rundlöf y Arnér, 2004).

1.6.1.1 Tiorredoxinas

Las tioredoxinas son unas proteínas pequeñas, de aproximadamente 12 kDa, originalmente descubiertas en 1964 en *E. coli* como donadores de hidrógenos para la ribonucleótido reductasa (Laurent *et al.*, 1964).

Las tioredoxinas, ubicuas desde procariontes hasta mamíferos, contienen un sitio activo conservado (Cys-Gly-Pro-Cys) que cataliza reacciones reversibles de oxidación-reducción mediante la transferencia de equivalentes reductores desde los residuos de cisteína del sitio catalítico al enlace disulfuro de las proteínas diana ($X-S_2$) (Holmgren, 1968; Holmgren, 1995). Así, la función principal de las tioredoxinas es, catalizar la reducción de los enlaces disulfuro inter e intramoleculares y la reducción de la forma de ácido sulfénico de algunas proteínas oxidadas. La forma oxidada de la tioredoxina ($Trx-S_2$), vuelve a su forma reducida $[Trx-(SH)_2]$ por acción de la tioredoxina reductasa (TrxR) y del NADPH (Figura 1.4) (Holmgren y Björnstedt, 1995; Holmgren, 2000; Nordberg y Arnér, 2001).

Bacterias, levaduras y plantas contienen distintas Trxs citosólicas, pero en mamíferos únicamente se ha identificado una tioredoxina citosólica denominada Trx1 (Wakasugi *et al.*, 1990). Trx1, codificada por el gen *TXN1*, es posiblemente la tioredoxina más estudiada hasta el momento. Se sabe que ésta transloca a núcleo bajo determinadas condiciones, donde regula la

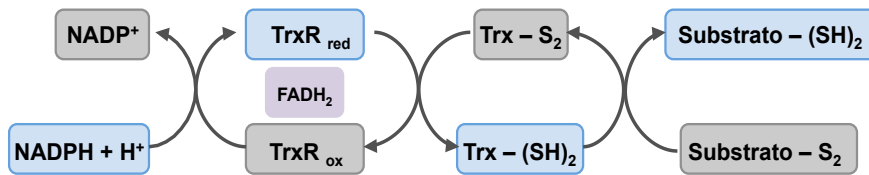


Figura 1.4 Cascada redox del sistema tioredoxina. El sistema tioredoxina está formado por la nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH), por la tioredoxina reductasa (TrxR) y la tioredoxina (Trx). La tioredoxina utiliza a los equivalentes reductores del NADPH para reducir a sus sustratos oxidados.

actividad de algunos factores de transcripción (*Hirota et al., 1999*). También, se ha demostrado que Trx1 sufre *splicing* alternativo que genera variantes de ARNm que no se traducen en proteínas funcionales, pero que sin embargo se ha propuesto que pueden contribuir en mecanismos de regulación en los que también participan, de manera independiente, tres residuos de cisteína estructurales (Cys62, Cys69 y Cys73) fuera de su sitio activo (Cys32 y Cys35) (*Engström et al., 1974; Holmgren, 1977*). La segunda de las variantes tioredoxina identificada en humano es de localización mitocondrial y corresponde a Trx2 (*TXN2*), la cual contiene una señal de translocación a mitocondria formada por una secuencia de 60 aminoácidos en su extremo N-terminal. Trx2, a diferencia de Trx1, no contiene residuos Cys estructurales, haciendo de Trx2 una enzima mucho más resistente a la oxidación que Trx1 (*Damdimopoulos et al., 2002; Spyrou et al., 1997*).

El genoma de mamíferos también codifica a otras tioredoxinas, y proteínas que contienen dominios tioredoxina, algunas de las cuales son específicas de espermatozoide tales como SpTrx-1, SpTrx-2, SpTrx-3 y Txl-2, donde esta última además se localiza en el pulmón y otros tejidos ciliados (*Jiménez et al., 2004; Miranda-Vizueté et al., 2001; Sadek et al., 2001; Sadek et al., 2003*). Txl-1, también referida como TXNL-1 o TRP32, es una proteína citosólica ubicua que está involucrada en el metabolismo de la glucosa, en la endocitosis (*Jiménez et al., 2006; Lee et al., 1998*) y recientemente su funcionalidad se ha relacionado con el proteasoma (*Andersen et al., 2009; Wiseman et al., 2009*).

Existen otros miembros de la familia de las tioredoxinas que se localizan específicamente en el retículo endoplásmico; por ejemplo, la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y ERdj5. La primera (PDI), realiza el plegamiento de proteínas nacientes al asistir la formación de enlaces disulfuro mediante reacciones de oxidación e isomerización (*Ellgaard y Ruddock, 2005; Kozlov et al., 2010*); y la segunda (ERdj5), funciona como chaperona en la degradación de proteínas mal plegadas (UPR) dentro del mismo orgánulo (*Cunnea et al., 2003; Dong et al. 2008; Ushioda et al., 2008*). Finalmente, la nucleoredoxina (Nrx), otro miembro de la familia de las tioredoxinas, se expresa en todos los tejidos y funciona como un regulador redox de algunos factores de transcripción y en la vía de señalización de la Wnt/ β -catenina (*Funato et al., 2006; Hirota et al., 2000; Kurooka et al., 1997*).

Dentro de las funciones más importantes que desarrolla Trx1 se incluye su acción como agente antioxidante al detoxificar directamente al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y al radical hidroxilo (OH^\cdot) (*Das y Das, 2000*). También elimina algunas ERO de forma indirecta, al funcionar como agente reductor de la metionina sulfóxido reductasa (*Brot y Weissbach, 1983*) y de las peroxirredoxinas 1, 2, 4 y 5 (*Rhee et al., 2005*). Se ha descrito que la forma reducida de Trx1 al unirse a ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) inhibe su actividad quinasa y la subsecuente cascada de apoptosis dependiente de ASK1 (*Saitoh et al., 1998*). Dentro del núcleo celular, Trx1 reduce al factor redox-1 (REF1), el cual en su estado reducido activa al factor de transcripción AP-1 (*Activator Protein 1*) (*Hirota et al., 1997; Wei et al., 2000*). Trx1 también reduce a REF1 para aumentar la actividad transcripcional del factor inducible por hipoxia 1 (HIF1) (*Welsh et al., 2002*) y para regular la activación del supresor de tumores p53 (*Jayaraman et al., 1997; Ueno et al., 1999*). Por otro lado, Trx1 mantiene a los residuos Cys de algunos factores de transcripción en su forma reducida requerida para la unión al ADN, estos factores de transcripción son el factor nuclear (NF)- κ B (*Hayashi et al., 1993; Matthews et al., 1992*), el receptor de

glucocorticoides (*Makino et al., 1996*) y el receptor de estrógeno (*Hayashi et al., 1997*).

Por las funciones tan importantes que desarrolla Trx1 en procesos de diferenciación celular y apoptosis, resulta esencial en el desarrollo, ya que su inactivación en modelos *knock-out* de ratones genera letalidad embrionaria provocando la muerte poco tiempo después de la implantación, lo cual sugiere que Trx1 en mamíferos es esencial para la diferenciación y morfogénesis temprana del embrión (*Matsui et al., 1996*).

1.6.1.1.1 La tioredoxina mitocondrial

La tioredoxina mitocondrial (Trx2) de mamíferos también posee el sitio activo conservado Cys-Gly-Pro-Cys y también tiene una actividad enzimática reductora de enlaces disulfuro. Como se mencionó anteriormente, posee en su extremo N-terminal 60 aminoácidos que tienen característica de señal de translocación mitocondrial y, a diferencia de Trx1, no posee residuos de Cys estructurales (*Damdimopoulos et al., 2002; Spyrou et al., 1997*).

Trx2 puede funcionar como agente antioxidante al actuar como donador de electrones de la peroxirredoxina mitocondrial (Prx3) para eliminar al peróxido de hidrógeno generado vía MnSOD (*Zhang et al., 2007*) y, también puede actuar como agente regulador en mecanismos de muerte celular (*Tanaka et al., 2002*); por ejemplo, la forma reducida de Trx2, al igual que Trx1, se une a ASK1 para inhibir sus funciones apoptóticas (*Zhang et al., 2004*). Trx2 además, interactúa con el receptor glucocorticoide mitocondrial para mantener el dominio de unión al ADN en su forma activa reducida y también, interactúa con la forma oxidada de la subunidad p65 del factor mitocondrial NF- κ B para propiciar su activación tras estímulos apoptóticos (*Psarra et al., 2009*). La interacción Trx2-Receptor glucocorticoide, a diferencia de lo que se conoce en Trx1 (*Makino et al., 1999*), es independiente del estado redox de Trx2.

Por otro lado, así como Trx1 aumenta la actividad transcripcional del factor inducible por hipoxia 1 (HIF1) vía Ref-1 (*Welsh et al., 2002*), Trx2 actúa de forma contraria al reducir la actividad de HIF1 en condiciones de hipoxia disminuyendo su traducción por mecanismos aún desconocidos (*Zhou et al., 2007; Zhou et al., 2008*).

De esta manera, y por vías que aún se desconocen, Trx2 parece desarrollar papeles cruciales en la protección contra el estrés oxidativo y en la regulación de vías de señalización de apoptosis mitocondrial, ya que embriones de ratón Trx2 *-/-* resultan letales al mostrar una apoptosis masiva en el día 10.5 post-coito y al morir el día 12.5, donde el tiempo de letalidad embrionaria coincide con la maduración mitocondrial, ya que en esta etapa de la embriogénesis se inicia la fosforilación oxidativa (*Nonn et al., 2003*).

1.6.1.2 Tiorredoxina reductasas

Las tiorredoxina reductasas (TrxR) pertenecen a la familia de las piridín nucleótido disulfuro óxidoreductasas y son unas enzimas homodiméricas que contienen un grupo prostético FAD en cada subunidad. Su función principal, es la de catalizar la reducción del sitio activo disulfuro de la tiorredoxina oxidada usando al NADPH como donador de electrones (*Gromer et al., 1999; Holmgren y Björnstedt, 1995*).

Las tiorredoxina reductasas existen en prácticamente todos los seres vivos; en bacterias, levaduras y plantas cada subunidad que conforma al homodímero de las TrxR es de aproximadamente 35 kDa, mientras que las subunidades de las TrxR de mamíferos y vertebrados son de aproximadamente 55 kDa. Estas propiedades han dividido a las TrxR en dos subgrupos; TrxR pequeñas y TrxR grandes (*Gromer et al., 2004*). La TrxR de *E. coli* tiene una especificidad de sustratos muy estrecha al reducir únicamente a su propia Trx. En plantas y levaduras las TrxR tienen características muy similares a la enzima bacteriana. Sin embargo, las TrxR grandes de mamíferos son más complejas, tienen una

especificidad de sustratos más amplia y, a diferencia de las TrxR pequeñas, en su mayoría son selenoproteínas (*Gladyshev et al., 1999; Tamura y Stadtman, 1996*).

Las TrxR de mamífero contienen selenio en forma de selenocisteína (Sec), residuo que ha sido reconocido como el aminoácido número 21 (*Böck et al., 1991; Stadtman, 1996*). El residuo de Sec es codificado por el codón UGA que normalmente es un codón que especifica el cese de la traducción; sin embargo, en las selenoproteínas UGA se codifica como Sec por la presencia de una secuencia de inserción de Sec, llamada elemento SECIS, presente en el extremo 3'-UTR del ARNm (*Bar-Noy et al., 2001; Böck et al., 1991; Stadtman, 1996*). El residuo Sec resulta esencial para la actividad catalítica normal de las TrxR y se suele localizar en el sitio activo C-terminal formando parte del tetrapéptido Gly-Cys-Sec-Gly-COOH (*Gladyshev et al., 1996; Lee et al., 2000; Zhong y Holmgren, 2000*).

En mamíferos existen tres isoformas distintas de tiorredoxina reductasas codificadas por tres genes diferentes. TrxR1 es la tiorredoxina reductasa citosólica codificada por el gen *TXNRD1* (*Tamura y Stadtman, 1996; Zhong et al., 1998*), la TrxR2 codificada por el gen *TXNRD2* es de localización mitocondrial (*Chae et al., 1999; Miranda-Vizueté et al., 2000*) y la TGR o tiorredoxina glutatión reductasa, codificada por el gen *TXNRD3*, se localiza principalmente en espermatozoide (*Su et al., 2005*). Tanto TrxR1 y TrxR2 están sujetas a *splicing* alternativo, codificando distintas isoformas que difieren principalmente en sus secuencias N-terminales (*Miranda-Vizueté y Spyrou, 2002; Osborne y Tonissen, 2001; Rundlöf et al., 2004; Su y Gladyshev, 2004*). Los transcritos alternativos correspondientes al gen *TXNRD1* son los más estudiados hasta ahora y, aunque se ha observado que su expresión resulta ser específica en tejidos, células o bajo condiciones de crecimiento, las funciones moleculares específicas de cada uno de ellos aún permanecen

desconocidas, (*Damdimopoulos et al., 2004; Osborne y Tonissen, 2001; Rundlöf et al., 2004*).

Las tiorredoxina reductasas de mamífero, además de reducir específicamente a las tiorredoxinas, suelen tener una especificidad de sustratos muy amplia reduciendo también al ácido lipoico (*Arnér et al., 1996*), a la vitamina K (*Luthman y Holmgren, 1982*) o al aloxan (*Holmgren Lyckeberg, 1980*). Además, la TrxR-1 puede reducir a la ubiquinona (*Xia et al., 2003*) y puede reciclar al dehidroascorbato para formar ascorbato (*May et al., 1997*). Algunos compuestos que contienen selenio como el selenito (*Kumar et al., 1992*), el ebseleno (*Zhao et al., 2002*), la selenocisteína (*Björnstedt et al., 1995*), el metilseleniato (*Gromer y Gross, 2002*) y el selenodiglutatión (*Björnstedt et al., 1992*) también son sus sustratos.

Al igual que la Trx1, la TrxR1 es la mejor caracterizada y se ha implicado en la regulación de factores de transcripción tales como p53, HIF1 y AP-1. Se ha observado que las prostaglandinas modifican covalentemente e inhiben la función de la TrxR1 llevando a la represión de los factores p53 e HIF1 (*Moos et al., 2003*). La expresión génica dependiente de p53 es inhibida en levaduras en ausencia de TrxR1 debido a la oxidación y a la posterior inactivación que sufre Trx1, sugiriendo que el efecto de TrxR1 sobre la actividad de p53 es mediada por la reducción de Trx1 (*Merwin et al., 2002; Pearson y Merrill, 1998*). TrxR1 también regula la activación de AP-1 a través de la reducción de Trx1 (*Karimpour et al., 2002*).

Por sus funciones independientes, o a través de Trx1, TrxR1 resulta esencial para el desarrollo, ya que en modelos *knock-out Txnrd1* de ratones ocurre letalidad embrionaria en el día 9.5 tras la implantación, observándose un bloqueo en la formación del mesodermo, malformaciones en la mayoría de los tejidos y una deficiencia en la formación de tejidos embrionarios avanzados que

provocan un retardo en el crecimiento (*Bondareva et al., 2007; Jakupoglu et al., 2005*).

1.6.1.2.1 Tiorredoxina reductasa mitocondrial (TrxR2)

La tiorredoxina reductasa mitocondrial tiene propiedades bioquímicas similares a la TrxR1, siendo capaz de reducir a la Trx2 así como a compuestos tales como el ácido ditionitrobenzoico, el selenito y el aloxan (*Rackham et al., 2011; Rigobello et al., 1998*). Además, la secuencia de la TrxR2 presenta una alta homología con la TrxR1 incluyendo los sitios de unión del FAD, del NADPH y el sitio activo conservado Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys (*Gasdaska et al., 1995; Miranda-Vizueté et al., 1999*). La TrxR2, a diferencia de la TrxR1, contiene una secuencia de localización mitocondrial presente en su extremo N-terminal (*Miranda-Vizueté et al., 1999*).

Mutantes nulos *Trxnrd2* en ratón resultan en letalidad embrionaria en el día 13 tras la implantación. Éstos, presentan una deficiencia severa en al hematopoyesis, una elevada apoptosis en el hígado, un desarrollo insuficiente del corazón, un descenso en la proliferación de los cardiomiocitos y una alta sensibilidad al estrés oxidativo (*Conrad et al., 2004*).

La importancia de los sistemas tiorredoxina, tanto en el desarrollo embrionario como en el mantenimiento de la homeostasis redox celular, ha sido destacada en estos dos últimos apartados. Es evidente que los miembros mejor caracterizados de entre las tiorredoxinas y las tiorredoxina reductasas son la Trx1 y la TrxR1 que en conjunto conforman al sistema tiorredoxina citosólico. Las funciones específicas que desarrolla el sistema tiorredoxina mitocondrial permanecen mucho más desconocidas, debido en parte a las dificultades que supone su estudio en mamíferos o en *Drosophila*, donde también ocurre letalidad larvaria (*Missirlis et al., 2002*). En esta tesis se tomó la decisión de realizar la caracterización del sistema tiorredoxina mitocondrial utilizando al nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio, un organismo que

se ha empleado ampliamente para elucidar diversos mecanismos moleculares por el alto grado de conservación que presentan con aquellos que se desarrollan en mamíferos (Kuwabara y O'Neil, 2001).

1.7 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

El nematodo *C. elegans*, ha sido establecido y utilizado como un excelente organismo modelo desde que Sydney Brenner en 1965 iniciase su estudio y caracterización genética. La facilidad de manejo de este organismo hizo que rápidamente su uso se extendiese prácticamente a todos los campos de la biología, tales como la biología del desarrollo, la apoptosis, la señalización celular, la plasticidad neuronal o el envejecimiento (Brenner, 1973; Brenner, 1974; Ellis y Horvitz, 1986; Riddle, 1978; Sulston y Horvitz, 1977; Kenyon, 2010).

C. elegans es un nematodo de vida libre, comúnmente encontrado en el suelo, que se alimenta principalmente de bacterias y cuyo ciclo de vida es de aproximadamente 3 días bajo condiciones óptimas de crecimiento. Existen dos sexos, los machos (XO) y los hermafroditas (XX). Los hermafroditas producen tanto esperma como oocitos y se pueden reproducir por autofecundación sin que sea necesaria la intervención de los machos. Los machos, los cuales surgen espontáneamente a baja frecuencia (0.1%), producen solo esperma, por lo que para reproducirse deben de aparearse con un hermafrodita. La autofecundación del hermafrodita permite a los nematodos homocigotos la generación de progenie genéticamente idéntica y, el apareamiento con los machos facilita la variabilidad genética y el traspaso de mutaciones entre estirpes (Riddle et al., 1997; Wood, 1988).

Ambos sexos tienen en general la misma anatomía y son de un tamaño similar, aunque el macho es un poco más delgado y pequeño que el hermafrodita. La principal diferencia entre ambos, radica en la organización de sus respectivas gónadas y en la forma de la cola, ya que el macho desarrolla estructuras

adicionales para facilitar la cópula (Figura 1.5). Además, el hermafrodita adulto tiene 959 células somáticas de las cuales 302 forman parte del sistema nervioso, mientras que el macho posee 1031 células somáticas y 79 células nerviosas más que el hermafrodita (Hope, 1999; Wood, 1988).

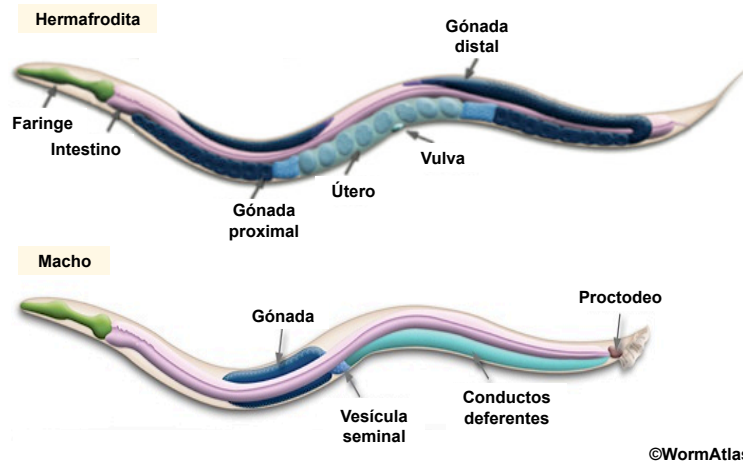


Figura 1.5 Esquema de un hermafrodita y de un macho adultos de *C. elegans*. Imagen lateral izquierda que representa la forma y algunas estructuras anatómicas de un macho y de un hermafrodita en *C. elegans*.

C. elegans es muy fácil de mantener en el laboratorio, donde puede crecerse en placas de agar o en cultivo líquido usando la bacteria *Escherichia coli* como fuente de alimento. Los nematodos por lo general son convenientemente observados y manipulados con la ayuda de un microscopio de disección y, debido a que los animales son transparentes a lo largo de todo su ciclo de vida, su desarrollo puede seguirse a nivel celular en preparaciones observadas bajo microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Gracias a esta característica tan favorable de *C. elegans*, su linaje celular desde huevo fertilizado hasta adulto ha sido determinado por la observación de divisiones y migraciones celulares en nematodos vivos. Además, su tamaño tan pequeño (1 mm de longitud el nematodo adulto), ha permitido la descripción anatómica del animal completo (Riddle *et al.*, 1997; Wood, 1988; Sulston 1983; Sulston y Horvitz 1977).

El hecho de que el nematodo sea transparente, también ha permitido con relativa facilidad la determinación *in vivo* de cuándo y dónde es expresado algún gen específico, usando para ello construcciones etiquetadas con marcadores fluorescentes (Chalfie *et al.*, 2008). Además, gracias a su corto ciclo de vida y al modo de reproducción del hermafrodita, *C. elegans* es el organismo ideal para realizar estudios sobre desarrollo y envejecimiento (Wood, 1988).

1.7.1 Ciclo de vida de *C. elegans*

Bajo condiciones estándar de laboratorio, el crecimiento de *C. elegans* es rápido. Su ciclo de vida completo tarda aproximadamente 3.5 días a 20 °C y atraviesa por un período de desarrollo embrionario y por una etapa de desarrollo post-embrionario formado por cuatro estadios larvarios (L1-L4) hasta llegar a la etapa adulta (Figura 1.6). El final de cada estadio larvario se caracteriza por una muda, durante la cual una cutícula nueva es sintetizada y la vieja es eliminada. En este periodo, el bombeo de la faringe cesa y el animal entra en una etapa corta de letargo (Hope, 1999; Riddle *et al.*, 1997; Wood, 1988).

Al final del estadio larvario L2, y cuando las condiciones ambientales no son favorables, el nematodo entra en una fase larvaria alternativa llamada dauer en lugar de continuar con su desarrollo normal a larva L3. Factores ambientales tales como una densidad de población elevada, la ausencia de alimento y las altas temperaturas, actúan como señales que conducen hacia la formación del dauer. La larva dauer puede permanecer viable durante varios meses y cuando las condiciones ambientales son de nuevo favorables reactiva su ciclo de vida normal mudando nuevamente para convertirse en una larva L4 y posteriormente en adulto (Figura 1.6) (Riddle *et al.*, 1997; Wood, 1988).

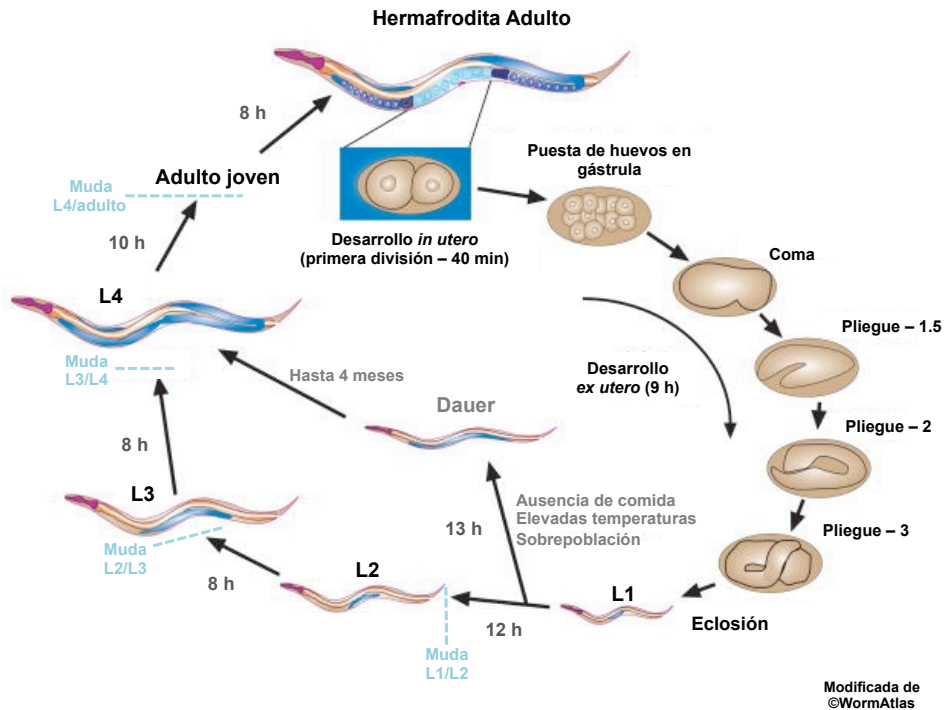


Figura 1.6 Esquema del ciclo de vida de *C. elegans*. En la imagen se muestra el ciclo de vida del nematodo a 22 °C. Los números entre las flechas indican el tiempo que está el nematodo en determinado estadio. La primera división ocurre aproximadamente 40 minutos después de la fecundación. Los embriones inician su desarrollo en el útero del nematodo y posteriormente son expulsados aproximadamente 150 minutos después de la fecundación y durante la fase de gástrula.

Un hermafrodita adulto produce oocitos durante aproximadamente 4 días, y después de este periodo fértil, el adulto maduro vive durante unos 10 o 15 días más. Un hermafrodita que se autofecunda, produce aproximadamente 300 embriones por su cantidad limitada de esperma; sin embargo, si ocurre apareamiento con algún macho, la cantidad de progenie se incrementa (*Hope, 1999; Riddle et al., 1997; Wood, 1988*).

1.7.2 Anatomía de *C. elegans*

C. elegans tiene la típica organización corporal de un nematodo la cual consiste de cutícula, hipodermis, neuronas y músculos, que rodean a una cavidad interna que contiene al intestino y a la gónada (Wood, 1988).

La cutícula es una estructura extracelular, compuesta principalmente de colágeno, que cubre las superficies más externas de todas las células hipodérmicas del nematodo, es flexible, protege al animal del medio exterior, mantiene su forma corporal y permite su motilidad al actuar como esqueleto externo. La cutícula es secretada por las células epiteliales (hipodermis y *seam cells*) y por las células interfaciales que perfilan a las cuatro aperturas principales hacia el exterior (ano, poro excretor, vulva y faringe). Antes de cada muda, se sintetiza una cutícula nueva y se elimina la anterior para permitir el crecimiento. Las cutículas de cada estadio larvario difieren en la expresión de proteínas de su superficie, en el número de capas, en el grosor relativo y en la composición, aparentemente para satisfacer los requerimientos presentados a lo largo del desarrollo y a las condiciones ambientales experimentadas durante la vida del animal (Figura 1.7) (Wood, 1988; Cox et al., 1981).

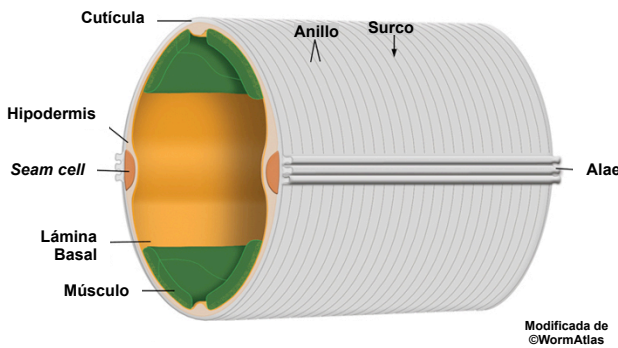


Figura 1.7 Esquema de la cutícula de un nematodo adulto. En la imagen se muestra la cutícula y su estructura externa junto con la hipodermis, la lámina basal, el músculo y las *seam cells*. Los órganos internos no aparecen representados para simplificar el modelo.

La musculatura corporal de *C. elegans* está formada por músculo estriado multisacromérico (somático) y por músculo no estriado (monosarcomérico). El músculo multisarcomérico es el más abundante, formado por 95 células, 14 de

las cuales son generadas después del desarrollo embrionario. El grupo de músculos no estriados en el hermafrodita incluye a 20 músculos de la faringe, 2 músculos estomato-intestinales, 1 músculo del esfínter anal, 1 músculo anal depresor, 8 músculos que forman parte de la vulva, 8 músculos uterinos y un músculo de la envoltura de la gónada contráctil. En el macho no existen músculos uterinos ni de la vulva o de la envoltura de la gónada, pero se encuentran presentes 41 músculos especializados en el apareamiento. Aunque la mayoría de las contracciones musculares son generadas por transmisiones nerviosas, hay tres ciclos de comportamiento rítmico en *C. elegans* que son dependientes de contracciones periódicas que emplean Ca^{++} intracelular; éstas son, el bombeo de la faringe causado por el músculo de la faringe, las contracciones de la envoltura de la gónada y el ciclo de defecación, aunque el primero y el último también son modulados por neuronas (Waterston, 1988).

El sistema nervioso de un hermafrodita adulto está formado por 302 neuronas que pertenecen a dos distintos e independientes sistemas nerviosos: un sistema nervioso somático (formado por 282 neuronas) y un sistema nervioso de la faringe (formado por 20 neuronas) los cuales se comunican a través de un par de interneuronas llamadas RIP (*Ring/Pharynx interneuron*) (Sulston y Horvitz, 1977; White et al., 1986). En el sistema nervioso somático, las neuronas y sus procesos están generalmente posicionados entre la hipodermis y las células musculares de cuerpo y, comparten una lámina basal con la hipodermis que aísla a las neuronas de las células musculares. En contraste, las neuronas de la faringe permanecen directamente entre los músculos de la faringe y nos son separados por ninguna lámina basal. La mayoría de las células del sistema nervioso se encuentran agrupados en ganglios en la faringe y en la cola. Desde cada uno de los ganglios los procesos neuronales se extienden hacia varias regiones de sinapsis, como lo son el anillo nervioso, el cordón ventral y el ganglio preanal. Además de los ganglios, otros cuerpos neuronales se localizan en grupo a lo largo del cordón ventral (Figura 1.8) (Chalfie y White, 1988).

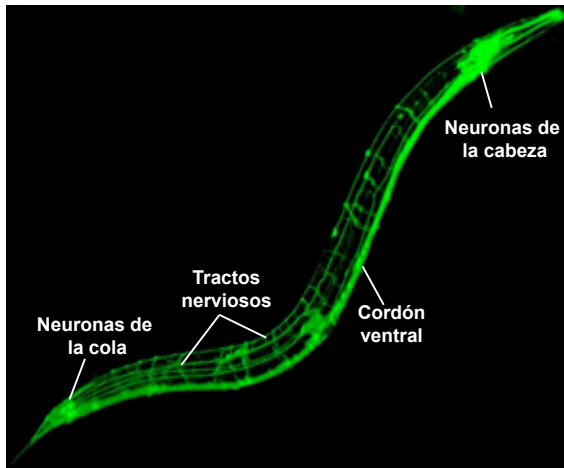


Figura 1.8 Sistema nervioso de un hermafrodita adulto. En la imagen se muestra un hermafrodita adulto expresando la proteína verde fluorescente (GFP) en todo su sistema nervioso.

El sistema nervioso del macho está formado por 473 células neuronales, 89 de las cuáles están involucradas en comportamiento de apareamiento del macho y están localizados en la parte posterior del cuerpo (*Emmons y Lipton, 2003; Sulston et al., 1980*).

C. elegans se alimenta de bacterias a través de una faringe bilobulada que bombea la comida hacia el intestino aplastándola conforme ésta pasa hacia el segundo lóbulo donde es triturada. La faringe conecta con el intestino a través de la válvula faríngeo-intestinal (*Albertson y Thomson, 1976; Altun y Hall, 2009*). El intestino, es una estructura tubular formada por 20 células, cada una de las cuales contiene una capa densa de microvellosidades en su superficie apical. El intestino da un giro de 180° a lo largo del animal, con la mayor parte del giro ocurriendo a la mitad del cuerpo del nematodo. El lumen del intestino está rodeado por un cuarteto de células en el extremo anterior y por dos filas de ocho pares de células que conectan con el recto por una válvula recto-intestinal (Figura 1.9) (*Altun y Hall, 2009b; Wood, 1988*).

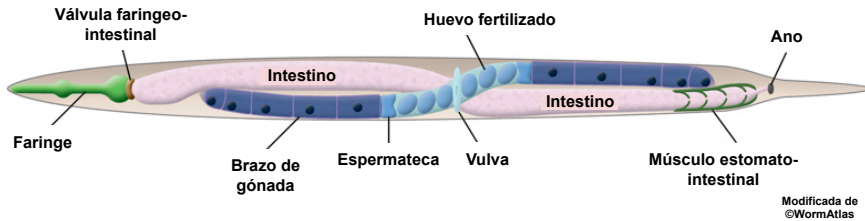


Figura 1.9 Sistema alimenticio de *C. elegans*. Esquema de la faringe bilobulada y del intestino de un hermafrodita adulto con respecto a otros órganos.

El sistema reproductor del hermafrodita está formado por una gónada simétrica bilobulada, con uno de los lóbulos extendiéndose hacia el extremo anterior y el otro hacia el extremo posterior desde el centro del nematodo. Cada lóbulo tiene forma de U y comprende un ovario distal, un oviducto proximal y una espermateca. Los ovarios contienen a la línea germinal, la cual alcanza la diacinesis en el oviducto previo a la fertilización. El oviducto en cada lóbulo termina con la espermateca que conecta a un útero común que contiene huevos fertilizados en etapas tempranas de la embriogénesis. El útero se abre hacia el exterior a través de una vulva para expulsar a los embriones (Figura 1.10) (Lints y Hall, 2009; Wood, 1988).

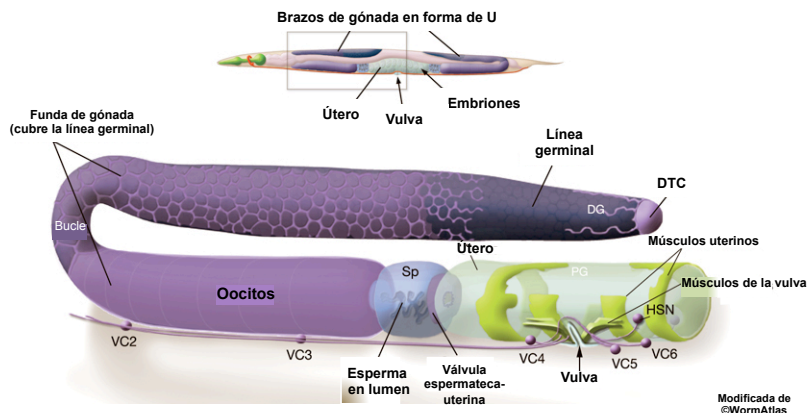


Figura 1.10 Sistema reproductor de un hermafrodita adulto. Arriba, un hermafrodita adulto con vista lateral izquierda mostrando la localización del sistema reproductor. El sistema reproductor contiene dos brazos simétricos en forma de U unidos por un útero en común. En la parte de abajo se muestra la mitad de la gónada separada de las demás partes del cuerpo. (DTC) *Distal tip cell*; (DG) gónada distal; (Sp) espermateca; VC1-6 y HSNL/R son neuronas motoras que controlan la puesta de huevos. La célula VC1 (no mostrada) está situada en un plano más anterior.

En el macho, la gónada tiene un solo lóbulo con forma de J que conecta en su extremo proximal a la cloaca del proctodeo. En su extremo distal, la línea germinal es mitótica y genera únicamente espermatozoides a lo largo de la vida del nematodo. Dos divisiones meióticas tienen que ocurrir para producir espermátides maduras, las cuales son almacenadas en vesículas seminales y liberadas durante la cópula a través de la cloaca. La cola del macho tiene neuronas, músculos y estructuras hipodérmicas especializadas para el apareamiento que le dan una apariencia distinta a la de la cola del hermafrodita (Figura 1.11) (Hodgkin, 1988; Klass et al., 1976).

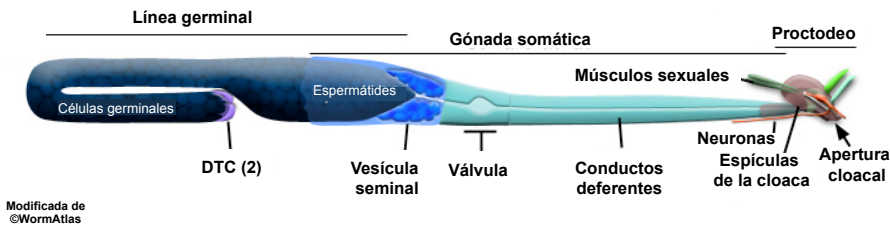


Figura 1.11 Sistema reproductor de un macho adulto. En la imagen se muestra la estructura de la gónada de un macho adulto (en forma de J) dividida en tres regiones principales; la línea germinal, la gónada somática y el proctodeo. Las células y tejidos que conforman a cada una de las regiones se muestran señaladas. (DTC) *Distal tip cell*.

1.7.3 *C. elegans* en el estudio del envejecimiento

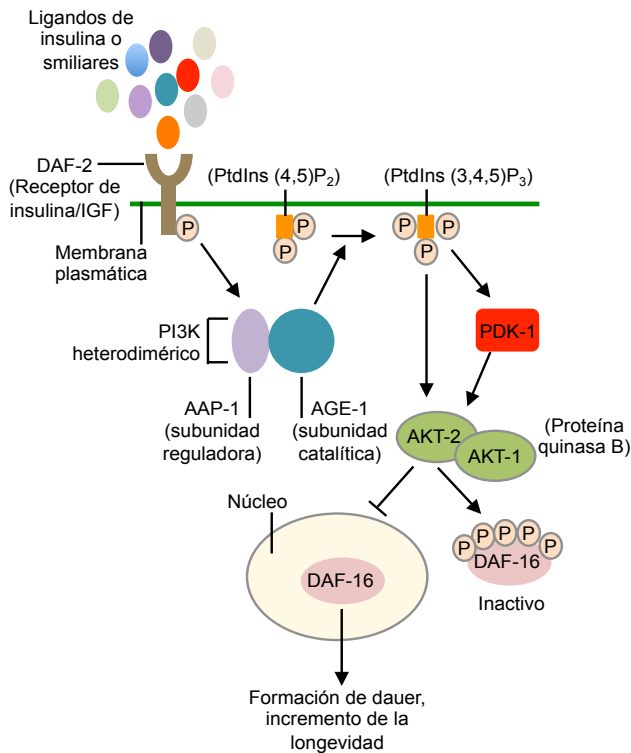
El nematodo *C. elegans* se ha convertido en un organismo modelo de gran importancia para elucidar los mecanismos genéticos y moleculares que causan el envejecimiento, gracias principalmente, a su ciclo de vida tan corto. El nematodo suele vivir aproximadamente tres semanas, y a lo largo de su desarrollo sufre cambios reminiscentes a aquellos observados en otros organismos; por ejemplo, conforme envejece se vuelve menos activo, muestra movimientos descoordinados y eventualmente deja de moverse. Otros cambios relacionados con la edad incluyen la acumulación de lipofuscina en el intestino, la presencia de estructuras vacuolizadas y la presencia creciente de proteínas oxidadas, características relacionadas con el envejecimiento también en mamíferos (Adachi et al., 1998; Herndon et al., 2002; Yasuda et al., 1999).

Cuando la disponibilidad de alimento es baja, o la densidad de población es elevada, *C. elegans* activa un programa de desarrollo alternativo que lleva a la formación de la larva dauer (ver sección 1.7.1). La larva dauer, que puede permanecer en esta fase del desarrollo durante varios meses, una vez que encuentra condiciones favorables en el ambiente reactiva su ciclo de vida normal, mudando para convertirse en una larva L4 y posteriormente en adulto. Muchas de las mutaciones que tienen un efecto en la formación de dauer también influyen en la longevidad y, la mayoría de estas mutaciones convergen con la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (Dorman *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1997; Larsen *et al.*, 1995; Tissenbaum y Ruvkun, 1998). Otras rutas genéticas que determinan la longevidad del nematodo incluyen a genes involucrados con la restricción calórica (Walker *et al.*, 2005), a genes involucrados con la función mitocondrial (Anson y Hansford, 2004), y a genes relacionados con la señalización de la línea germinal (Kenyon, 2010).

Las mutaciones presentes en la ruta de señalización de la insulina/IGF-1 son las mejor caracterizadas y suelen ser utilizadas como herramientas para experimentos de envejecimiento. En este sentido, los genes clave son: *daf-2*, *age-1* y *daf-16*. *daf-2* codifica al único receptor de la insulina/IGF-1 presente en el nematodo (Kimura *et al.*, 1997) y *age-1* codifica a la subunidad catalítica p110 de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que se encuentra por debajo de DAF-2 (Malone *et al.*, 1996). Mutaciones en los genes *daf-2* y *age-1*, provocan aumentos bastante significativos en la longevidad del nematodo, además de una elevada resistencia al estrés. *daf-16* codifica a un ortólogo del factor de transcripción tipo FOXO de humanos (Lin, 1997) y es requerido por todas las mutaciones identificadas en esta ruta para aumentar la longevidad (Gottlieb y Ruvkun, 1994; Kenyon *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1995).

DAF-2 señala a través de una cascada de quinasas hasta fosforilar al factor de transcripción tipo FOXO DAF-16. La fosforilación provoca que la chaperona 14-3-3 se una a DAF-16 y evite su translocación al núcleo (Biggs *et al.*, 1999);

sin embargo, sin la activación de DAF-2, DAF-16 es desfosforilado y transloca a núcleo para promover la transcripción de una serie de genes que inducirán resistencia a estrés y aumento en la longevidad (Figura 1.12). Algunos de los genes que activa DAF-16 son genes de respuesta a estrés (catalasas, SOD, S-transferasas y metalotioneinas), chaperonas, apolipoproteínas y lipasas (Wang *et al.*, 2008).



Modificada de
Partridge y Gems, 2002

Figura 1.12 Vía de señalización de la insulina/IGF en *C. elegans*. Tras la unión de los ligandos de insulina o similares a DAF-2, el dominio quinasa del receptor fosforila y activa a AGE-1. La activación de AGE-1 genera 3-fosfoinosítidos (PtdIns4,5-P₂ y PtdIns3,4,5-P₃) que actúan como segundos mensajeros requeridos para la activación de PDK-1, AKT-1 y AKT-2. Estas proteínas regulan al factor de transcripción DAF-16, el cual permanece inactivo en el citoplasma si es fosforilado. DAF-16 transloca al núcleo cuando ocurre su de-fosforilación para regular la expresión de genes involucrados en el metabolismo, autofagia, defensa inmunitaria y resistencia a estrés (Partridge y Gems, 2002).

La vía de la insulina también afecta a la longevidad en otros organismos, ya que mutaciones en el homólogo de DAF-2 (InR) en *Drosophila* y en ratones (IGF-1R, heterocigoto) aumentan la longevidad (Holzenberger *et al.*, 2003; Tatar *et al.*, 2001). En humanos, mutaciones que afectan al funcionamiento del receptor IGF-1 se encuentran en un grupo de centenarios judíos Asquenazí (Suh *et al.*, 2008); sin embargo, en mamíferos, cualquier otro tipo de perturbación específica en la vía de la insulina puede desencadenar al desarrollo de diabetes tipo 2 (Bartke, 2008; Selman *et al.*, 2008).

La restricción calórica es la única intervención no genética que aumenta la longevidad en la mayoría de las especies, desde levaduras hasta primates (Colman *et al.*, 2009). Se han descrito distintos métodos para incrementar la longevidad en *C. elegans* a través de la restricción calórica, estos métodos van desde mutaciones que provocan una disminución de la ingesta de alimento debido a un defecto en el bombeo de la faringe (*eat-2*), hasta diluciones de la bacteria que toma como alimento o la eliminación completa de ésta durante su fase adulta (Greer y Brunet, 2009).

La quinasa TOR (*target of rapamycin*) es un sensor de nutrientes que estimula el crecimiento y bloquea la autofagia cuando hay cantidades suficientes de alimento. La inhibición de la vía de señalización de TOR incrementa la longevidad desde levaduras hasta ratones (Harrison *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2004; Kaeberlein *et al.*, 2005; Kapahi *et al.*, 2004). La inhibición de TOR en *C. elegans* parece activar vías distintas a las de la insulina/IGF-1 ya que extiende la longevidad de manera independiente a DAF-16/FOXO (Hansen *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2004; Vellai *et al.*, 2003). En respuesta a la presencia de nutrientes, TOR induce un aumento de la traducción activando a la subunidad ribosomal S6 quinasa e inhibiendo a 4E-BP, un factor de inicio de la traducción. Cuando los nutrientes bajan y la actividad de TOR también, la traducción decae de igual manera. Esto tiene un impacto en la longevidad ya que al inhibir a la quinasa S6 se incrementa la longevidad en levaduras, nematodos, moscas y ratones

(Hansen et al., 2007; Kapahi et al., 2004; Pan et al., 2007; Selman et al., 2009). En moscas, el ARN mensajero que codifica a los componentes de la cadena transportadora de electrones es relativamente inmune a este ‘apagón’ traduccional, ya que la respiración celular se incrementa en respuesta a la inhibición de TOR. De igual manera, en ratones longevos *knock-out* de la S6 quinasa, se observan niveles elevados en el consumo de oxígeno (Um et al., 2004), sugiriendo que estos mecanismos podrían estar conservados.

Hasta el momento, la vía de señalización de TOR parece ser la más consistentemente ligada a la restricción calórica. La inhibición de TOR imita a los efectos fisiológicos de la restricción calórica, y en levaduras, nematodos y moscas, la extensión de la longevidad producida por la inhibición por TOR no es incrementada por restricción calórica (Bjedov et al., 2010; Hansen et al., 2007; Kaeberlein et al., 2005; Kapahi et al., 2004).

Por otro lado, la disfunción mitocondrial severa puede llegar a causar diversas patologías (ver sección 1.4), sin embargo una ligera inhibición de la respiración puede causar extensión de la longevidad en nematodos, moscas y ratones (Copeland et al., 2009; Lapointe y Hekimi, 2008; Lee et al., 2003; Rea et al., 2007). Una disrupción parcial en los componentes de la mayoría de los complejos de la cadena transportadora de electrones, así como en factores de ensamblaje, puede extender la longevidad del nematodo de un 20 a un 200% (Lee et al., 2003; Rea et al., 2007). El conjunto de estos mutantes longevos, incluyendo a aquellos definidos por ARN de interferencia, han recibido el nombre de “mutantes Mit” (Rea, 2005). El nivel de inhibición de la cadena respiratoria es muy importante en este caso; niveles bajos en la inhibición no influyen en la longevidad, una inhibición media lleva a la extensión de la longevidad y, mutantes nulos en los que una inhibición elevada afecta de forma severa a la cadena transportadora de electrones, tienden a tener una vida corta (Rea et al., 2007). Lo cual sugiere que existe un umbral en el que los mutantes Mit actúan, reteniendo cierto grado de funcionalidad de la cadena

transportadora de electrones y operando justo un nivel por encima del umbral antes de causar total disfunción.

Se ha propuesto que los mutantes Mit extienden la longevidad al reducir su tasa metabólica, ya que suelen tener un desarrollo embrionario y un crecimiento larvario ralentizado que puede generar un descenso en la producción de ERO, en este sentido, el envejecimiento también se ralentiza (Rea, 2005). Sin embargo, también se ha propuesto que un incremento moderado en la formación de ERO, causado por la disfunción mitocondrial, puede provocar efectos horméticos que promueven la activación de sistemas antioxidantes (Ventura y Rea, 2007). No obstante, también se ha sugerido que las condiciones anaeróbicas generadas por la disfunción mitocondrial activan un proceso de fermentación alternativo que genera ATP y mantiene el balance redox celular (Butler et al., 2010; Rea y Johnson, 2003).

Finalmente, se ha observado que los tejidos reproductivos en humanos, ratones, *Drosophila* y *C. elegans* influyen en la longevidad (Kenyon, 2010). La ablación por láser de la línea germinal extiende la longevidad del nematodo aproximadamente un 60%, mientras que la eliminación del sistema reproductor completo (línea germinal y gónada somática) no tiene el mismo efecto (Arantes-Oliveira et al., 2002; Hsin y Kenyon, 1999). En *C. elegans*, la pérdida de la línea germinal activa a DAF-16/FOXO por un mecanismo en el que, la proteína adaptadora KRI-1 y un factor de transcripción/elongación llamado TCER-1 son necesarios para que DAF-16 desencadene la transcripción normal de genes y consecuentemente extienda la longevidad (Kenyon, 2010). Esta vía reproductora actúa de forma aditiva a *daf-2*, ya que la pérdida de la línea germinal extiende de forma adicional la ya larga vida de mutantes *daf-2*. No se tiene claro si existen mecanismos similares en mamíferos; sin embargo, el sistema reproductor de éstos puede afectar a la longevidad. Por ejemplo, si los ovarios de un ratón joven son trasplantados a un receptor viejo, su longevidad se ve incrementada (Cargill et al., 2003).

1.7.4 *C. elegans* como organismo modelo en el estudio de patologías humanas

El análisis funcional de genes ortólogos en varios modelos genéticos ha dado como resultado el avance en el entendimiento de los mecanismos moleculares de algunas enfermedades humanas. Tras la determinación del genoma completo de *C. elegans* en diciembre de 1998 (*The C. elegans Sequencing Consortium, 1998*) se ha estimado que aproximadamente un 42% de genes relacionados con enfermedades humanas tienen un ortólogo en el genoma del nematodo (*Aboobaker y Blaxter, 2000; Culetto y Sattelle, 2000*).

En general, existen tres técnicas distintas para obtener un modelo de enfermedad humana en el nematodo; el primero, es generar un mutante *knock-out*, o realizar silenciamiento por ARN de interferencia (ARNi), del gen homólogo en *C. elegans* causante de la enfermedad humana para investigar el fenotipo resultante (*Kamath et al., 2003*); el segundo, es elegir un proceso en el nematodo que reproduzca ciertos aspectos celulares o moleculares del mecanismo de la enfermedad; y el tercero, es expresar el gen humano en el nematodo para inducir algún fenotipo relacionado con la enfermedad, esta última aproximación es particularmente útil si el producto del gen interfiere con el funcionamiento celular normal.

Usando alguno de los tres métodos anteriores, un gran número de enfermedades humanas se han investigado usando a *C. elegans* como organismo modelo (*Kaletta y Hengartner, 2006*). Un ejemplo es el uso del nematodo para estudiar la enfermedad autosómica dominante del riñón poliquístico. La patología primaria de esta enfermedad es el desarrollo de quistes en los riñones, los cuales gradualmente progresan hasta provocar fallos renales (*Delmas, 2004*). Aunque *C. elegans* posee un órgano bastante rudimentario, similar al riñón, formado por una única célula secretora, el silenciamiento o delección de los genes *lov-1* y *pkd-2*, ortólogos de los genes humanos de las policistinas *PKD1* y *PKD2* que causan la enfermedad, no

inducen ningún tipo de estructuras quísticas en el nematodo pero sin embargo causan un comportamiento aberrante en el apareamiento (*Barr et al., 2001; Barr y Sternberg, 1999*). Aunque el fenotipo resulta no tener relación alguna con la formación de quistes, el trabajo subsecuente determinó el funcionamiento anómalo de las policistinas. Un análisis detallado sobre el comportamiento en el apareamiento reveló que LOV-1 y PKD-2 tienen un papel crucial de señalización en los extremos ciliados de las neuronas sensoriales específicas del macho, lo cual llevó a la hipótesis de que las policistinas humanas son requeridas por las células ciliadas para sensar la presión o el flujo de fluidos (*Kaletta et al., 2003*). Los estudios en ratones posteriormente confirmaron que las policistinas realmente median el flujo de los fluidos en el cilio primario de las células epiteliales renales (*Lipton, 2005; Nauli et al., 2003*).

Por otro lado, el desarrollo de modelos transgénicos se ha usado principalmente para investigar desórdenes neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington o las taupatías. En algunos de estos casos no se han identificado genes ortólogos en *C. elegans*, como es el caso de la Huntingtina (el gen humano asociado a la enfermedad de Huntington) (*Imarisio et al., 2008*). Sin embargo, se han generado nematodos transgénicos que expresan, en el extremo N-terminal del gen humano Huntingtina distintas longitudes en repeticiones de poliQ, para estudiar los mecanismos que provocan el daño celular causado por la formación de agregados de poliQ (*Brignull et al., 2006; Morley et al., 2002; Parker et al., 2001; Satyal et al., 2000*). Aproximaciones similares se están utilizando para estudiar la enfermedad de Alzheimer, con transgénicos que expresan el péptido humano β -amiloide en las células musculares del nematodo y que muestran un fenotipo de parálisis progresivo (*Link, 1995*), o con transgénicos que expresan a la proteína humana α -sinucleína para estudiar los mecanismos de toxicidad causados por la formación de inclusiones relacionadas con la enfermedad de Parkinson (*van Ham et al., 2008; Lakso et al., 2003*).

C. elegans también está surgiendo como un modelo genético atractivo para el estudio de interacciones hospedador-patógeno al ser bastante susceptible al ataque de algunos patógenos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*, entre otros (Alegado et al., 2003; Breger et al., 2007; Tan et al., 1999). Se ha demostrado que muchos de los mecanismos de virulencia usados por los patógenos para causar enfermedades en humanos son también importantes para causar la enfermedad en *C. elegans*, incluyendo la infección persistente del intestino, la colonización en la cutícula del nematodo por la formación de biofilms y, la muerte vía toxinas como la toxina botulinum, el cianuro de hidrógeno o el peróxido de hidrógeno (Sifri et al., 2005). De forma similar, componentes en el sistema de defensa se encuentran evolutivamente conservados entre humanos y nematodos (Gravato-Nobre y Hodgkin, 2005; Kurz y Ewbank, 2003).

Los factores de virulencia microbiana tales como el *quorum sensing* o el sistema de secreción tipo III de bacterias Gram negativas son importantes para matar al nematodo (Tenor et al., 2004). El elevado nivel de solapamiento entre los factores de virulencia requeridos para la patogénesis en nematodos y humanos valida el uso de *C. elegans* como un huésped sustituto. Es por esto que estirpes patógenas pueden ser ensayadas en el nematodo para identificar factores de virulencia o viceversa, mutantes del nematodo pueden ser ensayados frente a determinados patógenos para entender mejor los mecanismos de patogénesis y respuesta del huésped.

A pesar de las tantas ventajas que ofrece *C. elegans* como organismo modelo, también brinda limitaciones intrínsecas que pueden restringir su aplicación en el descubrimiento de tratamientos terapéuticos. Por ejemplo, algunas vías moleculares simplemente no existen en el nematodo y es por eso que no pueden ser estudiadas en él. Sin embargo, y aunque el modelo del nematodo no recapitula a la perfección la patofisiología de la enfermedad humana, sí

permite el uso de aproximaciones genéticas y moleculares para conocer los mecanismos de toxicidad y determinar los factores *in vivo* que exacerban o curan determinadas condiciones patológicas.

CAPÍTULO II.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la caracterización funcional del sistema tiorredoxina mitocondrial en el nematodo *Caenorhabditis elegans* con el objeto de establecer un modelo experimental sencillo que permita estudiar el papel de dicho sistema en la fisiopatología de metazoos. Para llevar a cabo este objetivo general, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación y caracterización genética y bioquímica de los genes que conforman el sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans*.
2. Determinación de los patrones de expresión de los genes que conforman el sistema tiorredoxina mitocondrial del nematodo.
3. Caracterización fenotípica de los mutantes de *C. elegans* en el sistema tiorredoxina mitocondrial
4. Implicación del sistema tiorredoxina mitocondrial del nematodo en modelos de *C. elegans* de enfermedades neurodegenerativas.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS

3.1 Identificación del sistema tiorredoxina mitocondrial en *C. elegans*

Debido a que la ausencia de los sistemas tiorredoxina mitocondrial o citosólico en distintos organismos modelo tales como el ratón o *Drosophila melanogaster* resulta en letalidad embrionaria y larvaria respectivamente (Conrad et al., 2004; Nonn et al., 2003; Missirlis et al., 2002; Matsui et al., 1996; Bondareva et al., 2007), se conoce aún muy poco acerca de las funciones de este sistema redox en el contexto de un organismo completo. Por ello, la mayor parte de los estudios realizados para conocer la biología de las tiorredoxinas se han llevado a cabo en cultivos celulares *in vitro* o en mutantes condicionales de los modelos anteriormente mencionados (Conrad et al., 2004; Geisberger et al., 2007; Jakupoglu et al., 2005; Soerensen et al., 2008).

Por las diversas ventajas que ofrece el nematodo *C. elegans* como herramienta de estudio de distintos procesos biológicos *in vivo*, decidimos realizar la caracterización del sistema tiorredoxina mitocondrial en este modelo con el objetivo de elucidar sus posibles funciones en un organismo completo.

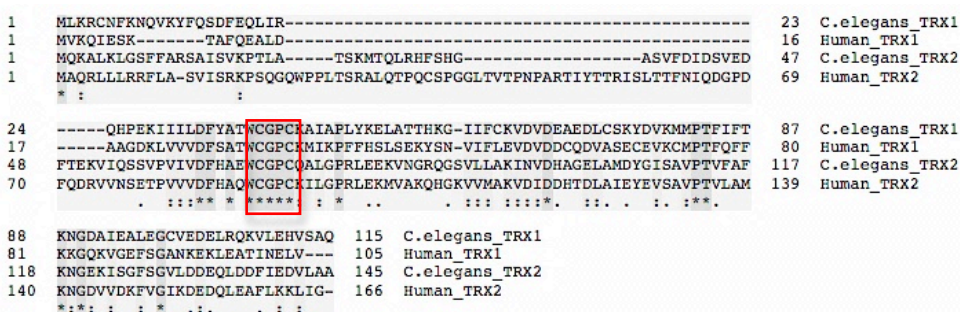
Trabajos previos en los que se realizaron análisis genómicos *in silico* así como ensayos de actividad enzimática *in vitro* han identificado dos genes que codifican a dos tiorredoxina reductasas distintas en *C. elegans*: *txr-1* y *txr-2* (Gladyshev et al., 1999; Lacey y Hondal, 2006). TRXR-1 es una enzima citosólica que en su sitio catalítico C-terminal contiene al aminoácido selenocisteína necesario para su actividad enzimática (Stenvall et al., 2010). Por otro lado, TRXR-2 contiene una potencial secuencia señal de entrada a mitocondria (MTS) en su extremo amino terminal que concuerda con la secuencia consenso del modelo de las dos proteasas (Hendrick et al., 1989), lo que sugiere su localización mitocondrial. TRXR-2, a diferencia de TRXR-1, contiene un residuo de cisteína en lugar de uno de selenocisteína en su sitio catalítico conservado C-terminal.

Para efectuar la caracterización completa del sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* fue necesario realizar una búsqueda bioinformática en el

(<http://psort.hgc.jp/>).

mamífero.

de TRX-1 y TRXR-1 del nematodo (Figuras 3.1 y 3.2).



por el método Clustal W en UniProt.org.

61

3.2 Estudio de la actividad enzimática de *trx-2* de *C. elegans*

Trabajos previos realizados por Lacey y Hondal (Lacey y Hondal, 2006), han demostrado por ensayos enzimáticos que la TRXR-2 de *C. elegans* funciona como una tiorredoxina reductasa al presentar una elevada actividad catalítica de reductasa frente a una Trx de *E. coli*. Es por esto que en este apartado, decidimos centrarnos únicamente en la caracterización enzimática de la TRX-2 del nematodo.

Las tiorredoxinas se caracterizan por su elevada capacidad catalítica disulfuro reductasa sobre diversas proteínas sustrato; así pues, para demostrar que el gen *B0024.9/trx-2* se comporta bioquímicamente como una tiorredoxina se realizaron ensayos de actividad enzimática por reducción de los puentes disulfuro de la insulina (Holmgren et al., 1995).

Como primer paso para este objetivo se purificó la proteína recombinante madura TRX-2, resultante tras la eliminación de la secuencia MTS, empleando el protocolo descrito en el apartado 6.8 de Materiales y Métodos.

Una vez purificada la proteína recombinante TRX-2 de *C. elegans* con cola de histidina en el extremo N-terminal (His-CeTRX-2) (Figura 3.3A), se realizó el estudio de su actividad enzimática como tiorredoxina de dos formas distintas; en el primero de los experimentos se empleó ditioneitol (DTT) como agente reductor de His-CeTRX-2 y, en el segundo caso se utilizó NADPH y TRXR-1 de

¹En la figura se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de TRXR-2 y TRXR-1 del nematodo junto con sus respectivas secuencias ortólogas humanas. Los residuos idénticos se encuentran señalados con un asterisco (y en gris intenso). Los residuos conservados se indican con uno o dos puntos dependiendo del grado de conservación, siendo los más conservados los que se indican con dos puntos. Las secuencias de los sitios activos C(V/A)NVGC y GC(C/X)G se muestran dentro de los recuadros rojos. La X denota el residuo de selenocisteína, ausente en TRXR-2 del nematodo. Los números a la derecha y a la izquierda hacen referencia a los residuos de aminoácidos. El alineamiento de secuencias se realizó por el método Clustal W en UniProt.org

hígado de rata. En ambos casos, la insulina se usó como proteína sustrato de His-CeTRX-2.

El ensayo con DTT se realizó siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (apartado 6.9); en este experimento se observó que después de 5 minutos de haber iniciado la reacción por adición del DTT, las lecturas de absorbancia a 595 nm aumentaban progresivamente como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuro de la insulina y su consiguiente precipitación, por acción de His-CeTRX-2. Este aumento se mantuvo durante los primeros 20 minutos, tras los cuales la reacción se estabilizó por reducción completa de la insulina (Figura 3.3B).

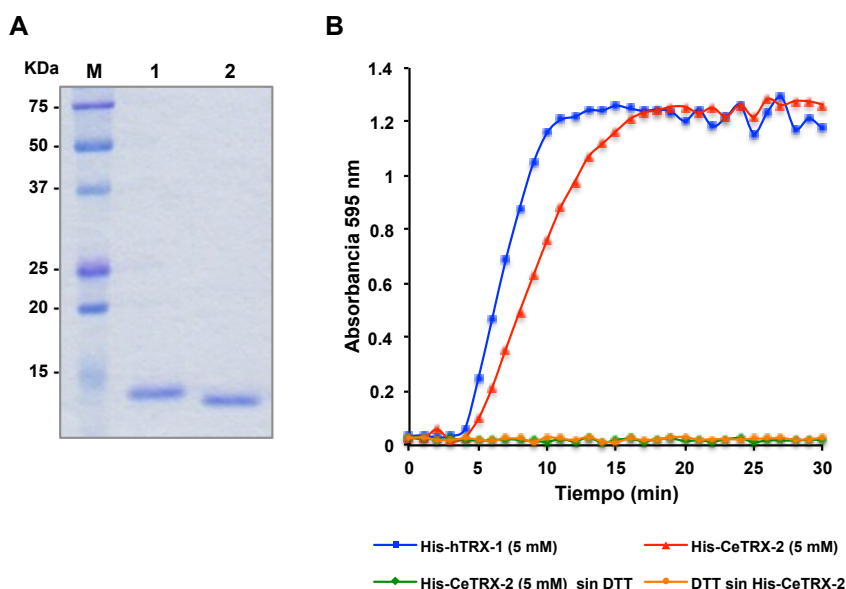


Figura 3.3 Actividad enzimática de TRX-2 de *C. elegans* usando DTT como agente reductor. (A) Gel SDS teñido con Coomassie que muestra el marcador de peso molecular (M) y las proteínas recombinantes purificadas His-hTRX-1 (carril 1) e His-CeTRX-2 (carril 2) utilizadas en los ensayos de actividad enzimática. (B) En la gráfica se muestra la actividad enzimática de la proteína recombinante TRX-2 de *C. elegans* con cola de histidina (His-CeTRX-2), medida por su capacidad de reducción de los puentes disulfuro de la insulina. Como control positivo se utilizó la TRX-1 humana también con cola de histidina (His-hTRX-1). Como control negativo se empleó la mezcla de reacción con proteína recombinante His-CeTRX-2 sin DTT y la mezcla de reacción incluyendo DTT sin His-CeTRX-2.

El ensayo en el que se empleó NADPH y tioredoxina reductasa 1 de hígado de rata, se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos (apartado 6.9). Esta determinación enzimática representa de una manera más fisiológica las reacciones en las que participan los sistemas tioredoxina dentro de la célula, en las cuales la tioredoxina oxidada (Trx-S_2) se revierte al estado reducido Trx-(SH)_2 por acción de la tioredoxina reductasa (TrxR), usando electrones del NADPH.

En este experimento se observó un descenso en las lecturas de absorbancia a 340 nm causado por el consumo de NADPH por parte de la tioredoxina reductasa 1 y por la consecuente reducción de la insulina por His-CeTRX-2 (Figura 3.4A). Por otro lado, a 595 nm se observó un incremento de la absorbancia durante los primeros 15 minutos de la reacción debido a la precipitación de la insulina causada por la actividad reductora de His-CeTRX-2 (Figura 3.4B).

La actividad enzimática de TRX-2 de *C. elegans* en ambos experimentos tiene un comportamiento prácticamente idéntico a la actividad enzimática de la TRX-1 humana usada como control positivo. Por lo tanto, concluimos que la proteína TRX-2 de *C. elegans*, codificada por el gen *B0024.9/trx-2*, funciona enzimáticamente como una tioredoxina.

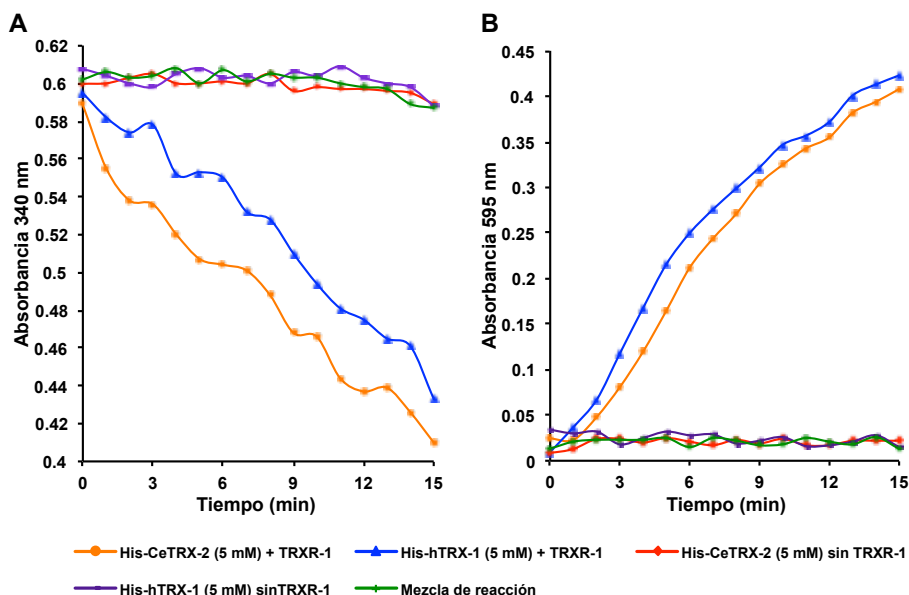


Figura 3.4 Actividad enzimática de TRX-2 de *C. elegans* usando TRXR-1 y NADPH como sistema reductor. En ambas gráficas se muestra la actividad tiorredoxina de la proteína recombinante His-CeTRX-2, medida por su capacidad de reducción de los puentes disulfuro de la insulina usando TRXR-1 de hígado de rata y NADPH como sistema donador de electrones. (A) Descenso de la absorbancia a 340 nm que indica el consumo de NADPH por TRXR-1. (B) Aumento de la absorbancia a 595 nm por la precipitación de la insulina causada por la reducción de sus puentes disulfuro. Como control positivo se utilizó la proteína recombinante His-hTRX-1. Como control negativo se empleó la mezcla de reacción con proteína recombinante His-CeTRX-2 ó His-hTRX-1 sin TRXR-1 y, la mezcla de reacción incluyendo TRXR-1 sin tiorredoxina.

3.3 Estudio de la expresión del sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans*

El estudio de la expresión del sistema tiorredoxina mitocondrial del nematodo se realizó mediante la generación de animales transgénicos usando una batería de plásmidos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del gen de interés (construcción transcripcional) o bajo el control de la secuencia promotora más el gen (construcción traduccional).

Los plásmidos generados para este estudio, así como los pares de cebadores empleados para obtener dichas construcciones se muestran en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos.

Cabe mencionar, que el gen *trxr-2* es el tercero dentro de un operón (CEOP3556) formado por los genes *unc-32*, *tpk-1* y *trxr-2*. La expresión de la mayoría de los genes dentro de operones en *C. elegans* suele estar regulada por una maquinaria de *trans-splicing* que separa el pre-ARNm policistrónico en varios ARNm monocistrónicos en lugar de traducirlos como una sola unidad. Así, el ARNm del primer gen de un operón recibe en su extremo 5' secuencias de *trans-splicing* denominadas SL1 mientras que los ARNm de los genes internos del operón aceptan secuencias de *trans-splicing* distintas, denominadas SL2. No obstante, en algunos casos, genes dentro de operones reciben secuencias tanto SL1 como SL2 (Huang *et al.*, 2007). Estos operones, que se denominan operones 'híbridos', suelen presentar secuencias intergénicas capaces de funcionar como promotores internos. De esta manera, aquellos genes que reciben indistintamente secuencias SL1 o SL2 usan a SL2 cuando el transcrito proviene del promotor del operón, mientras que SL1 es usado cuando el transcrito procede del promotor proximal (Allen *et al.*, 2011).

Estudios previos han identificado que el gen *trxr-2* recibe secuencias SL1 y SL2 para ser transcrito (Blumenthal *et al.*, 2002; Hillier *et al.*, 2009). Dada esta característica, hipotetizamos la existencia de un promotor interno propio del gen *trxr-2*; por este motivo, las construcciones transcripcionales y traduccionales correspondientes al gen *trxr-2* se realizaron empleando por un lado, el promotor del operón *unc-32* y por el otro, utilizando el promotor interno del gen *trxr-2*.

Con cada uno de los plásmidos de expresión descritos en el apartado 6.3.2 se generaron los correspondientes animales transgénicos por microinyección siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.4 de Materiales y Métodos.

La fusión transcripcional *P_{trxr-2}::GFP* se expresa únicamente en las neuronas de la cabeza AIYR, AIYL y ASEL (Figuras 3.5A, B y C), las cuales fueron determinadas por su posición, por la morfología de sus axones y dendritas y

por experimentos de colocación empleando marcadores específicos para estas neuronas (Figuras 3.5D y E). En muy pocos animales transgénicos también se llegó a detectar señal en la neurona ASER aunque con una fluorescencia de más baja intensidad que las demás.

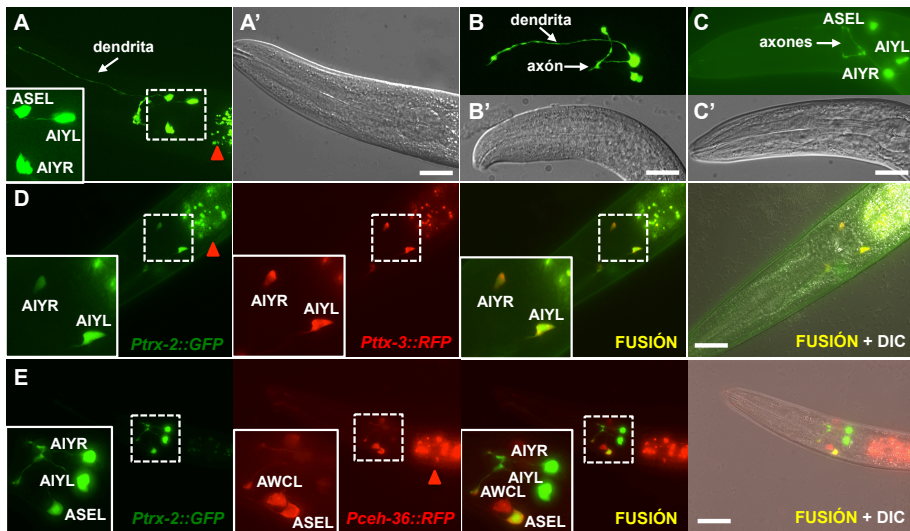


Figura 3.5 Patrón de expresión transcripcional del gen *trx-2* y colocación neuronal. Nematodos transgénicos expresando la fusión transcripcional *Ptx-2::GFP* se observaron en fluorescencia (A-C) y en DIC (A'-C'). Dobles transgénicos expresando simultáneamente las fusiones *Ptx-3::RFP* (Wenick y Hobert, 2004) (D) o *Pceh-36::RFP* (Ortiz et al., 2006) (E) junto con *Ptx-2::GFP* muestran colocación en las neuronas AIYR/L o ASEL, según corresponda, por el color amarillo-anaranjado observado en las fusiones de los canales rojo y verde. La RFP en las neuronas ASEL y AIYR/L no entra en núcleo, por eso en las imágenes de fusión se observa un núcleo verdoso (de *Ptx-2::GFP*) rodeado de un citoplasma amarillento. Las flechas rojas indican los gránulos autofluorescentes del intestino. La barra blanca indica la escala de 20 μ m.

El patrón de expresión del promotor de *unc-32*, el primer gen del operón en el que se incluye *trxr-2*, ha sido previamente descrito por Oka et al., 2001, quienes identifican fluorescencia en el cordón ventral, en neuronas de la cabeza y cola, en espermateca y válvula uterina, y en el intestino. Nosotros hemos confirmado la expresión en estas células y tejidos en animales transgénicos *Punc-32::GFP* y adicionalmente hemos identificado su expresión en las células musculares de la vulva y en los coelomocitos del nematodo (Figura 3.6). Este patrón de expresión, fue complementado con el observado en los

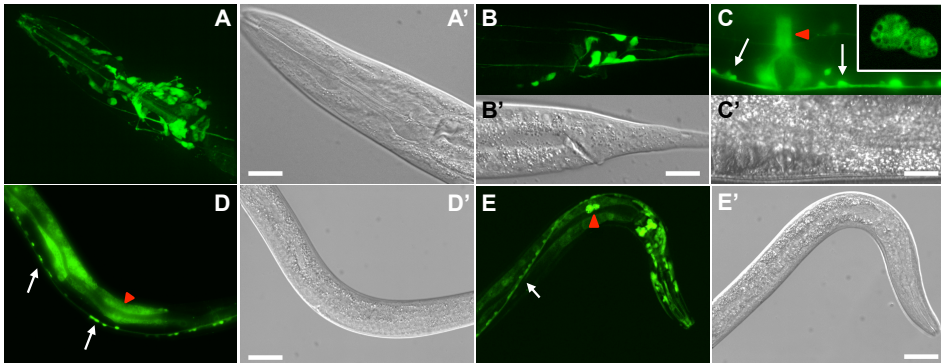


Figura 3.6 Patrón de expresión transcripcional del gen *unc-32*. Nematodos transgénicos expresando la fusión transcripcional *Punc-32::GFP* se observaron en fluorescencia (A-E) y en DIC (A'-E'). La expresión de la fusión *Punc-32::GFP* muestra fluorescencia en algunas neuronas de la cabeza (A) y cola (B), en el cordón ventral (flechas en C-E), en las células musculares de la vulva (triángulo rojo en C), en el intestino (triángulo rojo en D) y en los coelomocitos (inserto en C y triángulo rojo en E). La barra blanca indica la escala de 20 μ m.

transgénicos conteniendo la construcción transcripcional *Ptxr-2::GFP*, la cual se expresa en el intestino y en neuronas de la cabeza. En animales en estadio larvario L1 se observa expresión en únicamente 2 neuronas de la cabeza, sin embargo el número de neuronas fluorescentes aumenta conforme el animal crece hasta adulto (Figura 3.7).

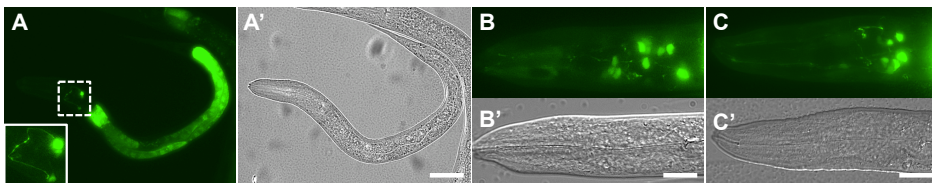


Figura 3.7 Patrón de expresión transcripcional del gen *trxr-2*. La expresión de la fusión transcripcional *Ptxr-2::GFP* se observó en fluorescencia (A-C) y en DIC (A'-C'). *Ptxr-2::GFP* se expresa en 2 neuronas de la cabeza en nematodos de estadio larvario L1 (A), mientras que en animales adultos se expresa en un mayor número de neuronas de la cabeza (B y C). También se observa expresión en el intestino (A), independientemente de la fase del desarrollo en la que se encuentre el nematodo. El inserto en (A) muestra la ampliación de la zona punteada. La barra blanca indica la escala de 20 μ m.

En conjunto, el patrón de expresión de las construcciones *Punc-32::GFP* y *Ptxr-2::GFP* sugiere que la expresión de TRXR-2 es ubicua en *C. elegans*, lo

cual contrasta con la expresión restringida de TRX-2 en únicamente 3 ó 4 neuronas de la cabeza.

La expresión de las fusiones traduccionales *Punc-32::trxr-2::GFP* y *Ptrxr-2::trxr-2::GFP* resultó congruente con la expresión en células y tejidos observada en las respectivas fusiones transcripcionales. La excepción ocurrió en los transgénicos expresando la fusión traduccional *Ptrxr-2::trxr-2::GFP*, ya que además de encontrar fluorescencia en las neuronas AIYR, AIYL y ASEL, también se detectó expresión en las células musculares, sugiriendo la existencia de secuencias reguladoras adicionales presentes en el marco abierto de lectura del gen *trx-2* (Figuras 3.8A y B).

Por otro lado, los transgénicos expresando cada una de las fusiones traduccionales mostraron un patrón de expresión compatible con una localización mitocondrial; así, la fusión *Ptrxr-2::trxr-2::GFP* se expresa en las células musculares de la cabeza, cuerpo y vulva mostrando una morfología tubular así como una expresión perinuclear punteada en las células neuronales AIYR/L y ASEL, cuya identificación fue relativamente impedida por la expresión en las células musculares de la cabeza (Figura 3.8A y B). La expresión de la construcción traduccional *Punc-32::trxr-2::GFP* muestra fluorescencia en la zona de la cabeza y en el cordón ventral con un patrón punteado, mientras que en el intestino la distribución mitocondrial se muestra con un patrón reticular que excluye al núcleo (Figuras 3.8C-F). Finalmente, la fusión traduccional *Ptrxr-2::trxr-2::GFP* mostró una fluorescencia perinuclear punteada en distintas neuronas de la cabeza y una expresión reticular en las células del intestino (Figuras 3.8G y H).

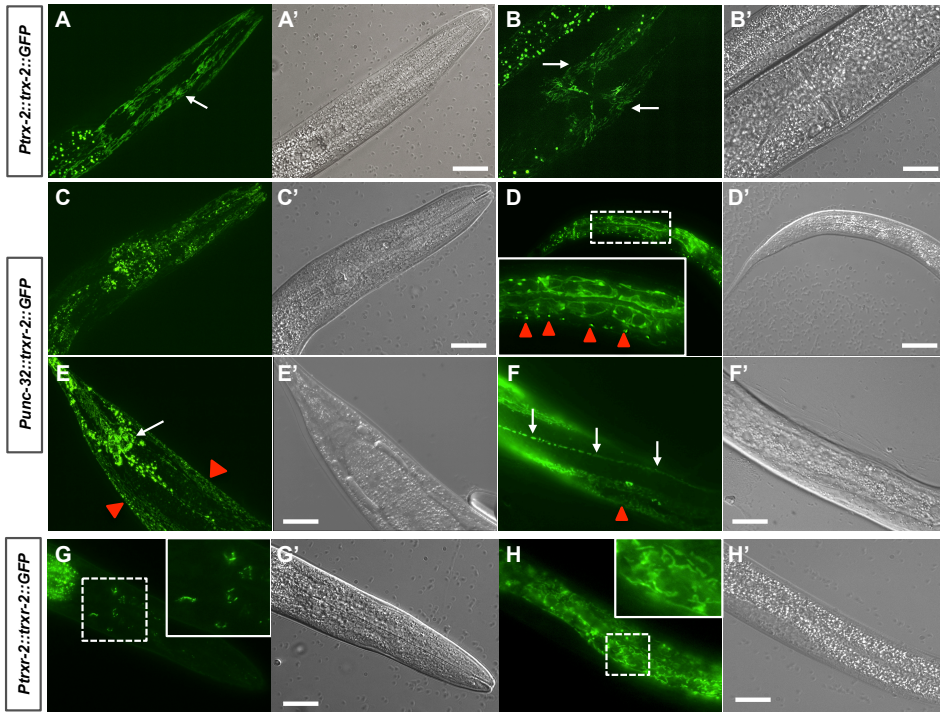


Figura 3.8 Patrón de expresión traduccional de los genes *trxr-2* y *trxr-2* de *C. elegans*. Todos los nematodos transgénicos expresando cada una de las fusiones traduccionales muestran un patrón fluorescente compatible con una localización mitocondrial; éstos, fueron observados en fluorescencia (A-H) y en DIC (A'-H'). Transgénicos expresando la construcción *Ptrx-2::trxr-2::GFP* muestran fluorescencia en las células musculares del cuerpo. En (A) se muestra la fluorescencia observada en células musculares de la cabeza (flechas) y en (B) en vulva (flechas), observando en ambas la típica morfología tubular mitocondrial. La identificación de las neuronas AIYR/L y ASEL fue relativamente impedida por la expresión de las células musculares de la cabeza. La fusión *Punc-32::trxr-2::GFP* se expresa con un patrón punteado en la mayor parte de las células de la cabeza (C), en el cordón ventral (triángulos rojos de inserto en D) y en las *seam cells* (flechas blancas en F), mientras que en las células del intestino las mitocondrias muestran un patrón reticular (D). También se observa localización mitocondrial en neuronas de la cola (flecha en E) y en las células musculares (triángulos rojos en E y F). La construcción *Ptrxr-2::trxr-2::GFP* se expresa en las mitocondrias de algunas neuronas de la cabeza (G) y en las mitocondrias de las células del intestino (H), donde éstas muestran un patrón reticular. Los insertos en D, G y H muestran una ampliación de la zona punteada. La barra blanca indica la escala de 20 μ m.

Para confirmar que tal patrón punteado corresponde a una localización mitocondrial, se realizaron ensayos de colocalización utilizando nematodos transgénicos expresando en sus células musculares la subunidad receptora del importador mitocondrial TOMM-20/F23H12.2 fusionada a la proteína roja

fluorescente mRFP. Como se puede apreciar en la figura 3.9, la proteína de fusión TOMM-20::RFP colocaliza en las células musculares de los nematodos que expresan las fusiones TRX-2::GFP y TRXR-2::GFP respectivamente. En aquellas células donde los niveles de expresión de ambas fusiones son similares, la colocalización se percibe de manera más evidente en color amarillo intenso.

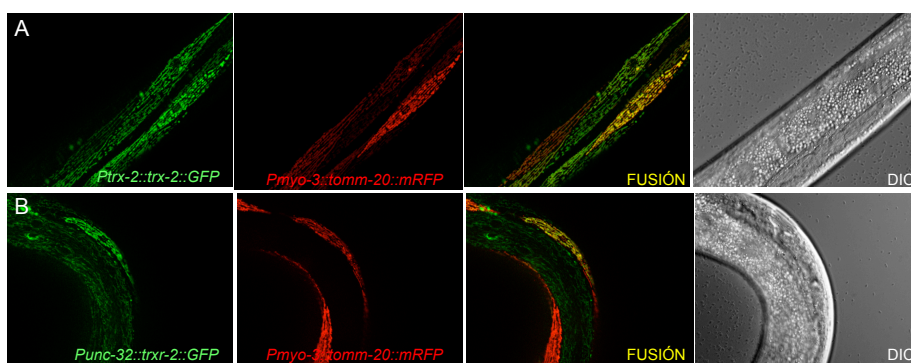


Figura 3.9 Colocalización mitocondrial de las fusiones TRX-2::GFP y TRXR-2::GFP. Dobles transgénicos expresando simultáneamente las fusiones *Ptrx-2::trx-2::GFP* (A) ó *Punc-32::trxr-2::GFP* (B) junto con TOMM-20::RFP presentan colocalización mitocondrial en las células musculares del nematodo, denotado por el color amarillo que se observa en la fusión de los canales rojo y verde.

Para demostrar que las secuencias señal de entrada a mitocondria (MTS) presentes en los extremos amino terminal de los genes *trx-2* (Figura 3.10A) y *trxr-2* (Figura 3.10C) son funcionales y son las responsables de señalar la localización de sus respectivas proteínas a mitocondria, realizamos fusiones con GFP en las que cada construcción contiene el promotor correspondiente de cada uno de los genes y su respectiva secuencia de localización mitocondrial anteriormente predicha. Así, transgénicos expresando las construcciones *Ptrx-2::MTS_{trx-2}::GFP* (Figura 3.10B), *Punc-32::MTS_{trxr-2}::GFP* (Figuras 3.10D y E) y *Ptrxr-2::MTS_{trxr-2}::GFP* (Figuras 3.10F y G) confirmaron que el patrón punteado, reticular o tubular, observado en nematodos expresando las fusiones

traduccionales, es debido a la localización mitocondrial de las proteínas TRX-2 y TRXR-2 dirigida por su respectiva MTS.

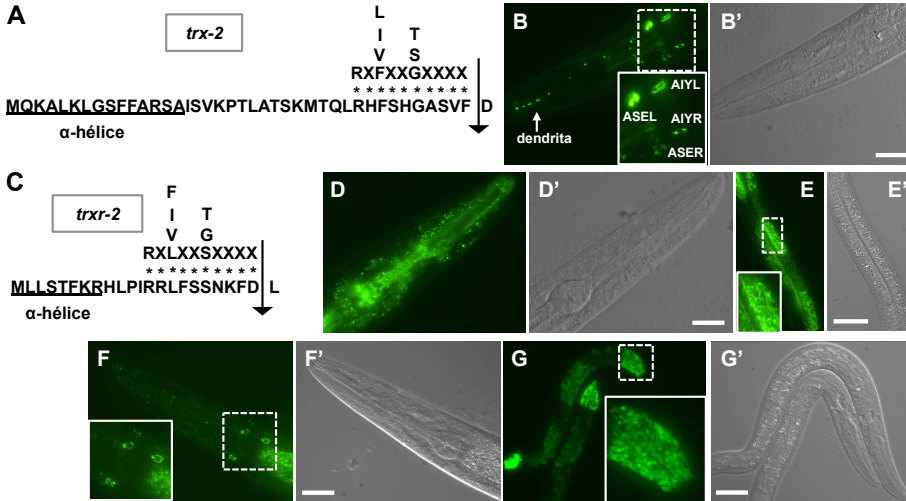


Figura 3.10 Expresión de la secuencia MTS de los genes *trx-2* y *trx-2* de *C. elegans*. (A y C) Secuencias N-terminales de los genes *trx-2* y *trx-2* respectivamente, que señalizan el importe mitocondrial. La flecha indica el sitio de corte de las proteínas, al momento de ser introducidas en la mitocondria, determinado por el motivo consenso del modelo de las dos proteasas (Hendrick *et al.*, 1989). Transgénicos expresando las fusiones *P_{trx-2}::MTS_{trx-2}::GFP*, *P_{unc-32}::MTS_{trx-2}::GFP* y *P_{trx-2}::MTS_{trx-2}::GFP* se observaron en fluorescencia (B, D-G) y en DIC (B', D'-G'). Los transgénicos *P_{trx-2}::MTS_{trx-2}::GFP* muestran fluorescencia en las mitocondrias de las neuronas ASEL y AIYL/R (B). En (D-G) se observa expresión mitocondrial debida a la secuencia MTS del gen *trx-2* dirigida por el promotor del gen *unc-32* (D y E) ó por su propio promotor interno (F y G). Los insertos en las fotografías muestran una ampliación de la zona punteada. La barra blanca indica la escala de 20 μm.

3.4 Caracterización genética de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial

Para evaluar el efecto fenotípico que causa la ausencia de los genes *trx-2* y *trx-2* a lo largo del desarrollo del nematodo, se utilizaron alelos de deleción disponibles para cada uno de ellos en el *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC) y en el *National Bioresource Project*. El gen *trx-2* se localiza en el cromosoma V, está constituido por 3 exones y existen disponibles dos alelos de deleción distintos, el *tm2720* y el *ok1526*. Debido a que la deleción *ok1526*, además de

eliminar al gen completo *trx-2* elimina también parte del gen 3' flanqueante, decidimos trabajar únicamente con el alelo *tm2720*, el cual deleciona 218 pb del tercer exón del gen *trx-2* (Figura 3.11A). Mediante análisis de RT-PCR del alelo *tm2720* se identificaron dos variantes cortas de ARNm que difieren la una de la otra por un evento adicional de *splicing* en su extremo 3'-UTR (Figuras 3.11B y 3.12).

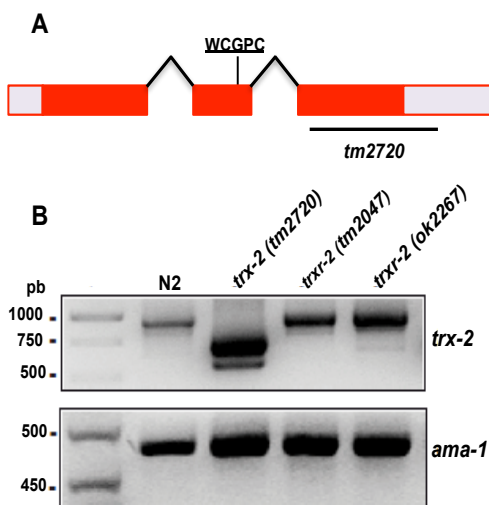


Figura 3.11 Organización genómica y expresión del ARNm de *trx-2* de *C. elegans*. (A) Estructura del gen *trx-2* de *C. elegans*. Los rectángulos indican los exones, mientras que las líneas intermedias señalan los intrones. Los rectángulos rojos indican la fase abierta de lectura, mientras que los rectángulos grises señalan las secuencias 5' y 3'-UTRs respectivamente. El sitio activo redox se localiza en el segundo exón. La línea inferior señala la región que elimina el alelo *tm2720*. (B) RT-PCR del gen *trx-2* en la estirpe silvestre N2 y en los mutantes simples *trx-2* y *trx-2* de *C. elegans*. La expresión constitutiva del gen *ama-1* se utilizó como control de carga.

Mientras que a la proteína silvestre madura TRX-2, generada después de eliminar la secuencia señal de entrada en mitocondria, la forman un total de 105 aminoácidos, la traducción de la variante del ARNm del alelo *tm2720* produce una proteína truncada Δ TRX-2 que carece de los últimos 50 aminoácidos en su extremo C-terminal (Figura 3.13). Entre los residuos que se eliminan en el mutante se incluyen aminoácidos necesarios para la interacción proteína-proteína o para la estabilización del sitio activo redox (*Eklund et al.*, 1991).

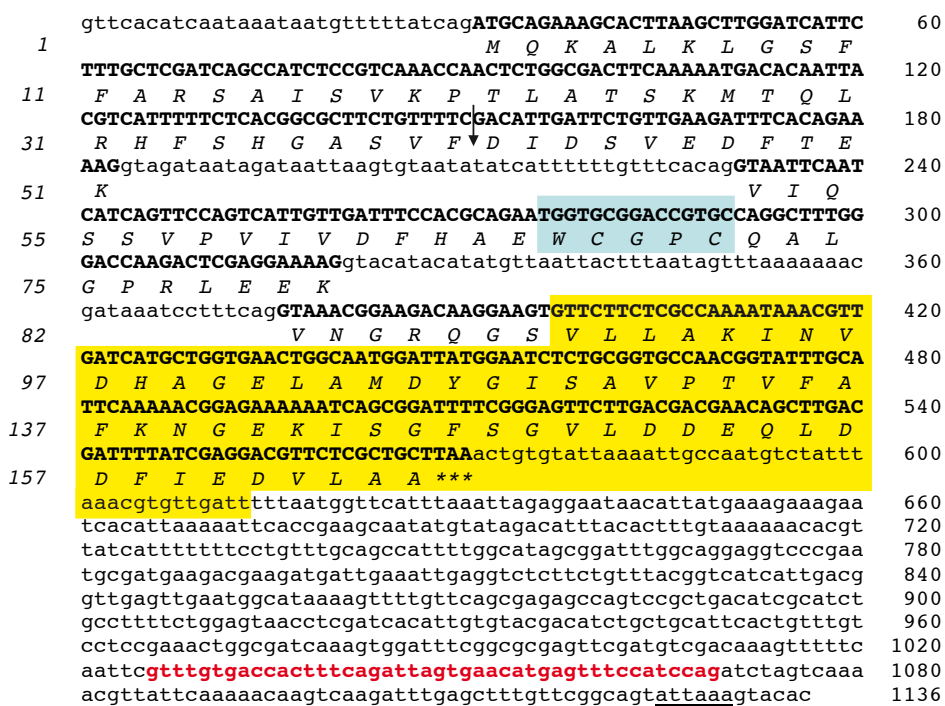


Figura 3.12 Análisis de la secuencia genómica y de aminoácidos del gen *trx-2* de *C. elegans*. En la secuencia genómica, la fase abierta de lectura se señala en mayúsculas mientras que los intrones y las secuencias 5' y 3'-UTR se indican en minúsculas. La numeración de los nucleótidos se encuentra del lado derecho mientras que la numeración de los aminoácidos está del lado izquierdo y en *itálicas*. La flecha indica el sitio de corte de la proteína al momento de ser introducida en la mitocondria, determinado por el motivo consenso del modelo de las dos proteasas (*Hendrick et al., 1989*). Los asteriscos indican el codón de paro y, el doble subrayado muestra la señal 3'-UTR de poliadenilación. La caja azul resalta al sitio activo WCGPC mientras que la caja amarilla denota la región que deleciona el aleo *tm2720*. En rojo se indica la nueva secuencia de *splicing* 3'-UTR identificada.

TRX-2_N2	MQKALKLGSFFARSAISVKPTLATSKMTQLRHFSHGASVFDIDSVEDFTE	50
TRX-2_ <i>tm2720</i>	MQKALKLGSFFARSAISVKPTLATSKMTQLRHFSHGASVFDIDSVEDFTE	50
TRX-2_N2	KVIQSSVPVIVDFHAEWCGPCQALGPRLEEKVNGRQGSVLLAKINVDHAG	100
TRX-2_ <i>tm2720</i>	KVIQSSVPVIVDFHAEWCGPCQALGPRLEEKVNGRQGS LMVHLN -----	94
TRX-2_N2	ELAMDYGISAVPTVFAFKNGEKISGFSGLDDEQLDDFIEDVLAA	145
TRX-2_ <i>tm2720</i>	-----	94

Figura 3.13 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TRX-2 de *C. elegans* y de la proteína truncada que genera el alelo *tm2720*. Análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos que conforman a la proteína truncada, codificada por el alelo *tm2720*, y a la proteína TRX-2 de la estirpe silvestre de *C. elegans*. Las letras azules señalan la secuencia de entrada a mitocondria, la cual es escindida para generar a la proteína madura una vez que ésta es importada a mitocondria. La secuencia en letras rojas indica el cambio en el marco de lectura que genera la delección del alelo *tm2720*. Los números a la derecha indican los residuos de aminoácidos.

Para demostrar que la delección *tm2720* elimina secuencias importantes que comprometen la funcionalidad de TRX-2, se realizaron ensayos de actividad enzimática para probar su eficacia catalítica de la misma manera que se menciona en el apartado 3.2 de esta sección de Resultados. Así pues, se realizaron dos ensayos de actividad enzimática distintos utilizando por un lado DTT y por el otro NADPH y tioredoxina reductasa 1 como agentes reductores de Δ TRX-2, e insulina bovina como aceptor final de electrones para ambas reacciones.

Como se muestra en la figura 3.14, la proteína recombinante Δ TRX-2 de *C. elegans* (His-Ce Δ TRX-2) no mostró actividad enzimática en ninguna de las reacciones, a diferencia de la actividad catalítica que presenta la proteína His-CeTRX-2 empleada como control positivo. Estos resultados sugieren que el alelo *tm2720* es un alelo de pérdida de función del gen *trx-2*.

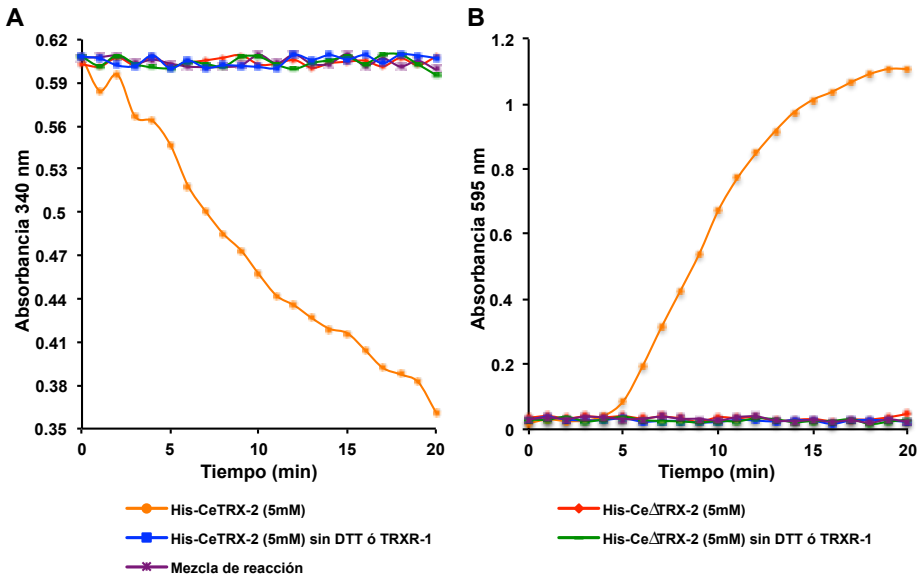
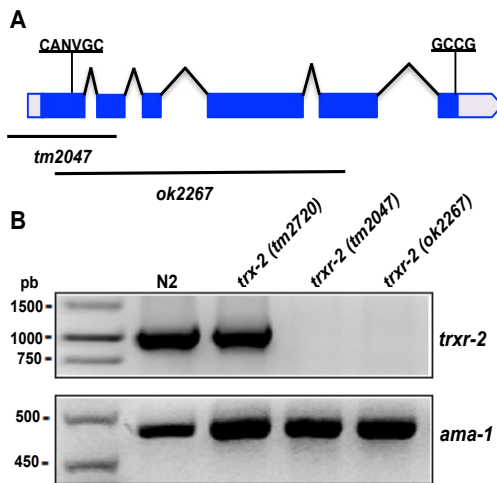


Figura 3.14 Actividad enzimática de His- Δ TRX-2 de *C. elegans* usando TRXR-1/NADPH o DTT como agentes reductores. En ambas gráficas se muestra la actividad tiorredoxina nula de la proteína recombinante His-Ce Δ TRX-2. (A) Descenso de la absorbancia a 340 nm que indica el consumo de NADPH por TRXR-1, provocado por la capacidad de reducción de la insulina de la proteína recombinante silvestre His-CeTRX-2 pero no de His-Ce Δ TRX-2. (B) Aumento de la absorbancia a 595 nm ocasionado por la precipitación de la insulina debido a la reducción de sus puentes disulfuro por acción de la proteína recombinante His-CeTRX-2 pero no de His-Ce Δ TRX-2. Como control positivo se utilizó la proteína recombinante His-CeTRX-2. Como control negativo se empleó la mezcla de reacción con proteína recombinante His-Ce Δ TRX-2 ó His-CeTRX-2 sin TRXR-1 ó sin DTT y, la mezcla de reacción incluyendo TRXR-1 ó DTT sin His-Ce Δ TRX-2 ó His-CeTRX-2.

Por otro lado, el gen *trxr-2* del nematodo se localiza en el cromosoma III, está constituido por 6 exones y existen dos alelos de delección denominados *tm2047* y *ok2267*. El alelo *tm2047* elimina en total 507 pb que abarcan una parte del promotor, el primer exón completo que contiene el sitio de inicio de la transcripción ATG, el sitio activo redox CANVGC presente en el extremo N-terminal y una parte del segundo exón. El alelo *ok2267* es una delección de 1649 pb que elimina parte del primer exón, los exones segundo, tercero y cuarto en su totalidad así como parte del quinto (Figura 3.15A).

Mediante el análisis de RT-PCR, usando cDNA total de animales *tm2047* y *ok2267*, determinamos que estos alelos son alelos nulos ya que no se produce ningún ARNm a diferencia de la estirpe silvestre o del mutante *trx-2* (*tm2720*) utilizados como controles (Figura 3.15B).



Cada una de las delecciones descritas tanto para el gen *trx-2* como para el gen *trx-2* son viables en el nematodo, resultado que contrasta considerablemente con los fenotipos de letalidad embrionaria descritos en ratones *knock-out* *trx-2* y *trx-2* (Conrad et al., 2004; Nonn et al., 2003) o con el fenotipo de letalidad larvaria, de la forma mitocondrial de la tiorredoxina reductasa, en *Drosophila* (Missirlis et al., 2002).

3.5 Análisis fenotípico de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans*

Los nematodos portadores de cada una de las delecciones del sistema tiorredoxina mitocondrial crecen de manera normal hasta adultos sin defectos embrionarios o post-embrionarios aparentes, son fértiles y poseen una morfología mitocondrial normal (Tabla 3.1; Figura 3.16). Dobles mutantes conteniendo los alelos *trx-2* (*tm2720*); *trx-2* (*tm2047*) y *trx-2* (*tm2720*); *trx-2*

(*ok2267*) también son viables y no manifiestan ningún fenotipo aparente; e incluso, dobles mutantes *trxr-1* (*sv47*); *trxr-2* (*tm2047*) y *trxr-1* (*sv47*); *trxr-2* (*ok2267*) en los cuales se deleta la tiorredoxina reductasa citosólica y mitocondrial muestran fenotipo silvestre.

Tabla 3.1 Cuantificación de la progenie de los mutantes *trx-2* y *trxr-2* de *C. elegans*.

Estirpe	Genotipo	Progenie ^a
N2	Silvestre	255 ± 57
VZ13	<i>trx-2</i> (<i>tm2720</i>) V	305 ± 61*
VZ12	<i>trxr-2</i> (<i>tm2047</i>) III	285 ± 41
VZ15	<i>trxr-2</i> (<i>ok2267</i>) III	251 ± 54
VZ17	<i>trxr-2</i> (<i>tm2047</i>) III; <i>trx-2</i> (<i>tm2720</i>) V	300 ± 53
VZ22	<i>trxr-2</i> (<i>ok2267</i>) III <i>trx-2</i> (<i>tm2720</i>) V	219 ± 62

^a Número de progenie ± desviación estándar (n=10).

* (P<0.05) Distribución t de Student .

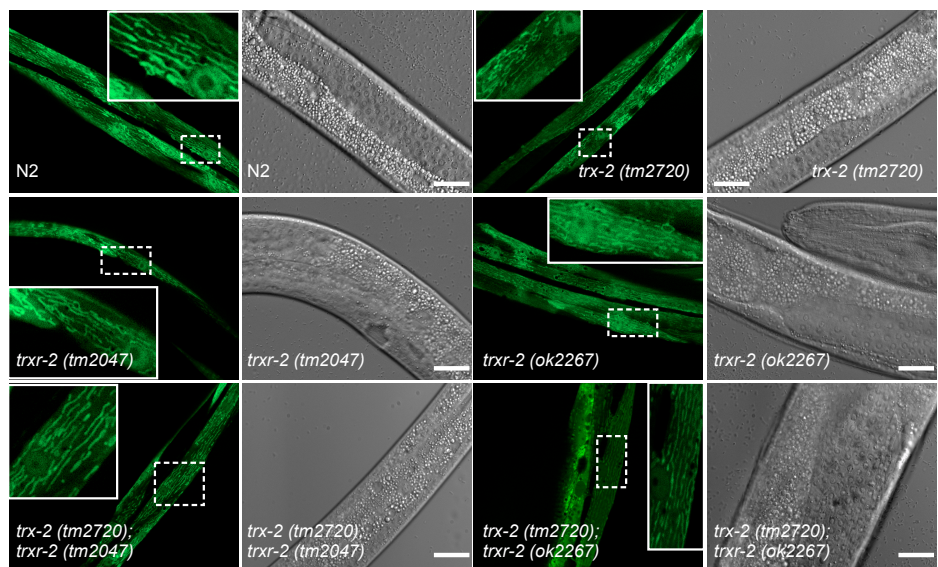


Figura 3.16 Morfología mitocondrial de mutantes simples y dobles *trx-2* y *trxr-2*. Mutantes simples y dobles *trx-2* y *trxr-2* expresando la construcción transcripcional *Pmyo::3::MTS::GFP* en las células musculares del nematodo, muestran una morfología mitocondrial normal con respecto a la estirpe silvestre N2. Escala de 20 μm.

La falta de fenotipo en los mutantes simples y dobles *trx-2* y *txxr-2* nos hizo pensar en la existencia de otros sistemas que, en ausencia del sistema tiorredoxina mitocondrial, fueran capaces de suplir sus funciones. Por esto, decidimos realizar ensayos de ARN de interferencia (ARNi) de algunos otros genes tiorredoxina presentes en el nematodo así como de aquellos genes que en *C. elegans* conforman a los sistemas glutarredoxina y peroxirredoxina, los cuales suelen estar íntimamente relacionados con las tiorredoxinas ya sea por compartir similitudes en su estructura y función (como las glutarredoxinas) o por ser dependientes de ellas para su reducción (peroxirredoxinas) (Kalinina *et al.*, 2008; Lillig y Holmgren, 2007; Meyer *et al.*, 2009). Sin embargo, el silenciamiento por ARNi de cada uno de los cuatro genes glutarredoxina o de los tres peroxirredoxina que contiene el nematodo así como de la glutatión reductasa y de otros genes tiorredoxina, en fondos mutantes simples y dobles *trx-2* y *txxr-2*, no resultó en ningún fenotipo sintético a pesar de que cada uno de los mutantes ensayados contenían además el alelo *rrf-3* (*pk1426*), el cual provoca un aumento de la sensibilidad al ARNi en el nematodo (Sijen *et al.*, 2001) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Genes silenciados por ARNi para identificar defectos sintéticos de crecimiento en mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial.^a

Categoría del gen	Nombre del gen	Código CGC del gen	Fenotipo sintético
Tiorredoxinas	<i>trx-1</i>	B0228.5	No
	<i>trx-2</i>	B0024.9	No
	<i>trx-3</i>	M01H9.1	No
	<i>txl</i>	Y54E10A.3	No
	<i>dnj-27</i>	Y47H9C.5	No
	-	Y44E3A.3	No
	-	K02H11.6	No
Tiorredoxina reductasas	<i>txxr-1</i>	C06G3.7	No
	<i>txxr-2</i>	ZK637.10	No
Glutarredoxinas	<i>glrx-5</i>	Y49E10.2	NA ^b
	<i>glrx-10</i>	Y34D9A.6	No
	<i>glrx-21</i>	ZK121.1	No
	<i>glrx-22</i>	C07G1.8	No

Categoría del gen	Nombre del gen	Código CGC del gen	Fenotipo sintético
Peroxisirredoxinas	<i>prdx-2</i>	F09E5.15	NA ^b
	<i>prdx-3</i>	R07E5.2	No
	<i>prdx-6</i>	Y38C1AA.11	No
Glutación reductasa	<i>gsr-1</i>	C46F11.2	No

^aTodos los ARNi fueron ensayados en nematodos portadores de los siguientes fondos genéticos:

NL2099, *rrf-3 (pk1426) II*

VZ29, *rrf-3 (pk1426) II; trx- 2 (tm2720) V*

VZ30, *rrf-3 (pk1426) II; trxr- 2 (tm2047) III*

VZ31, *rrf-3 (pk1426) II; trxr- 2 (ok2267) III*

VZ33, *rrf-3 (pk1426) II; ; trxr- 2 (tm2047) III; trx- 2(tm2720) V*

VZ38, *rrf-3 (pk1426) II; ; trxr- 2 (ok2267) III; trx- 2(tm2720) V*

^bNo aplicable. El ARNi de estos genes causó arresto larvario en L1-L2 en la estirpe control *rrf-3 (pk1426)*.

Estos datos sugieren que el sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* es prescindible para el desarrollo normal del nematodo bajo condiciones estándar de laboratorio.

3.5.1 El sistema tiorredoxina mitocondrial en la apoptosis de *C. elegans*

El sistema tiorredoxina mitocondrial de mamíferos juega un papel muy importante durante el proceso de apoptosis (*Damdimopoulos et al., 2002; Patenaude et al., 2004*); embriones de ratones *knock-out trx-2* mueren poco tiempo después tras la implantación por apoptosis masiva, mientras que ratones *knock-out trxr-2* también sufren letalidad embrionaria mostrando una elevada apoptosis en el hígado (*Conrad et al., 2004; Nonn et al., 2003*). *C. elegans* posee un linaje celular invariable, de las 1090 células generadas durante el desarrollo somático del hermafrodita, 131 sufren apoptosis. En 113 de estas 131 células, la apoptosis ocurre durante la embriogénesis, mientras que las restantes 18 se producen durante el desarrollo post-embrionario (*Sulston, 1983; Sulston y Horvitz, 1977*). Además, en la línea germinal del

adulto ocurre otra ronda de muerte celular programada para reducir el número de células que completarán la ovogénesis (*Gumienny et al., 1999*).

Debido a que el sistema tiorredoxina mitocondrial tiene un papel importante durante el proceso de apoptosis en otros organismos, quisimos averiguar si alguno de los mutantes *trx-2* o *trxr-2* del nematodo mostraba algún defecto en la regulación de dicho proceso. Para tal propósito, se utilizó videomicroscopía dimensional 4D en embriones mutantes *trx-2* y *trxr-2*, simples y dobles, para determinar la cinética de la apoptosis de los primeros 13 eventos de muerte celular programada que ocurren durante el linaje AB (*Nieto et al., 2010*).

Como se muestra en la figura 3.17, no se encontraron alteraciones significativas en la cinética de la apoptosis en embriones de mutantes simples y dobles del sistema tiorredoxina mitocondrial al ser comparados con embriones de la estirpe silvestre.

También, se midió la penetrancia de la muerte celular en la línea germinal en un conjunto de hermafroditas adultos pertenecientes a la misma serie de mutantes, y nuevamente no encontramos diferencias significativas en la cuantificación de apoptosis en este tejido (Tabla 3.3).

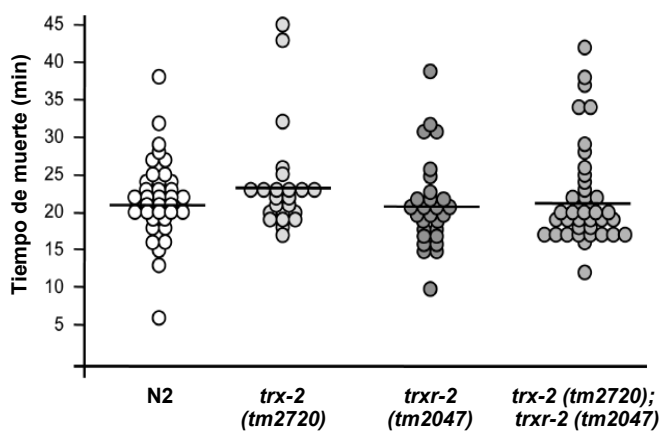


Figura 3.17 Cinética de apoptosis embrionaria en mutantes simples y dobles *trx-2* y *trx-2*. En el gráfico se muestra la medición del tiempo de muerte (definido como el tiempo desde que nace la célula hasta el momento en el que ocurre la apoptosis) de los primeros 13 eventos apoptóticos del linaje AB seguidos por microscopía 4D. Cada círculo representa una única célula, la posición del círculo a lo largo del eje Y indica el tiempo que tarda la célula en morir y la línea horizontal representa la media del tiempo de muerte de cada genotipo. El tiempo de muerte de las células apoptóticas presenta distribución Gaussiana, con valores de 21.8 ± 5.4 minutos después de su nacimiento en embriones con genotipo silvestre (N2), 23.8 ± 7.1 minutos para embriones *trx-2 (tm2720)*, 21.3 ± 6.1 minutos para embriones *trx-2 (tm2047)* y 22.1 ± 6.7 minutos para embriones *trx-2 (tm2720); trx-2 (tm2047)* (media \pm SD). Los análisis se realizaron en tres embriones independientes de cada fondo genético (n=23-39 células). En todos los casos $P > 0.05$ por la distribución t de student de dos colas.

Tabla 3.3 Cuantificación de cuerpos apoptóticos en gónadas de hermafroditas adultos silvestres y mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial.

Estirpes	Cuerpos apoptóticos ^a
N2	1.00 ± 1.17
<i>trx-2 (tm2720)</i>	0.90 ± 1.07
<i>trx-2 (tm2047)</i>	0.95 ± 0.88
<i>trx-2 (tm2720); trx-2 (tm2047)</i>	1.05 ± 0.94

^a Media de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada \pm desviación estándar (n=20). En todos los casos $P > 0.05$ por la distribución t de student de dos colas.

En conjunto, estos datos demuestran que en *C. elegans* el sistema tiorredoxina mitocondrial no regula la apoptosis.

3.5.2 Respuesta del sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* frente al estrés oxidativo

En general, se ha descrito que una de las principales funciones que desempeñan los sistemas tiorredoxina es como defensa frente al estrés oxidativo, causado ya sea por la propia respiración celular que se lleva a cabo en la mitocondria o por agentes externos (Arnér y Holmgren, 2000). Para determinar si estas funciones permanecen conservadas en el nematodo, se evaluó la sensibilidad de los mutantes *trx-2* y *trxr-2* frente a distintos agentes que inducen estrés oxidativo tales como el paraquat (Van Raamsdonk y Hekimi, 2009), el arsenito de sodio (Oláhová et al., 2008), la juglona (de Castro et al., 2004), el choque térmico (Finkel y Holbrook, 2000) y la azida de sodio (Artal-Sanz y Tavernarakis, 2009). Cada uno de estos ensayos se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 6.10 de la sección de Materiales y Métodos.

Aunque el mutante *trx-2* (*tm2720*) en el ensayo de estrés térmico y los mutantes *trx-2* (*tm2720*) y *trx-2* (*tm2720*); *trxr-2* (*tm2047*) en el tratamiento con paraquat muestran ligera resistencia, en ninguno de los tratamientos de estrés realizados se encontraron diferencias estadísticamente significativas de sensibilidad (Figura 3.18).

A continuación, evaluamos la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial usando el compuesto 2',7-dihidrofluoresceín diacetato (H₂-DCF-DA) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.10.2 de Materiales y Métodos.

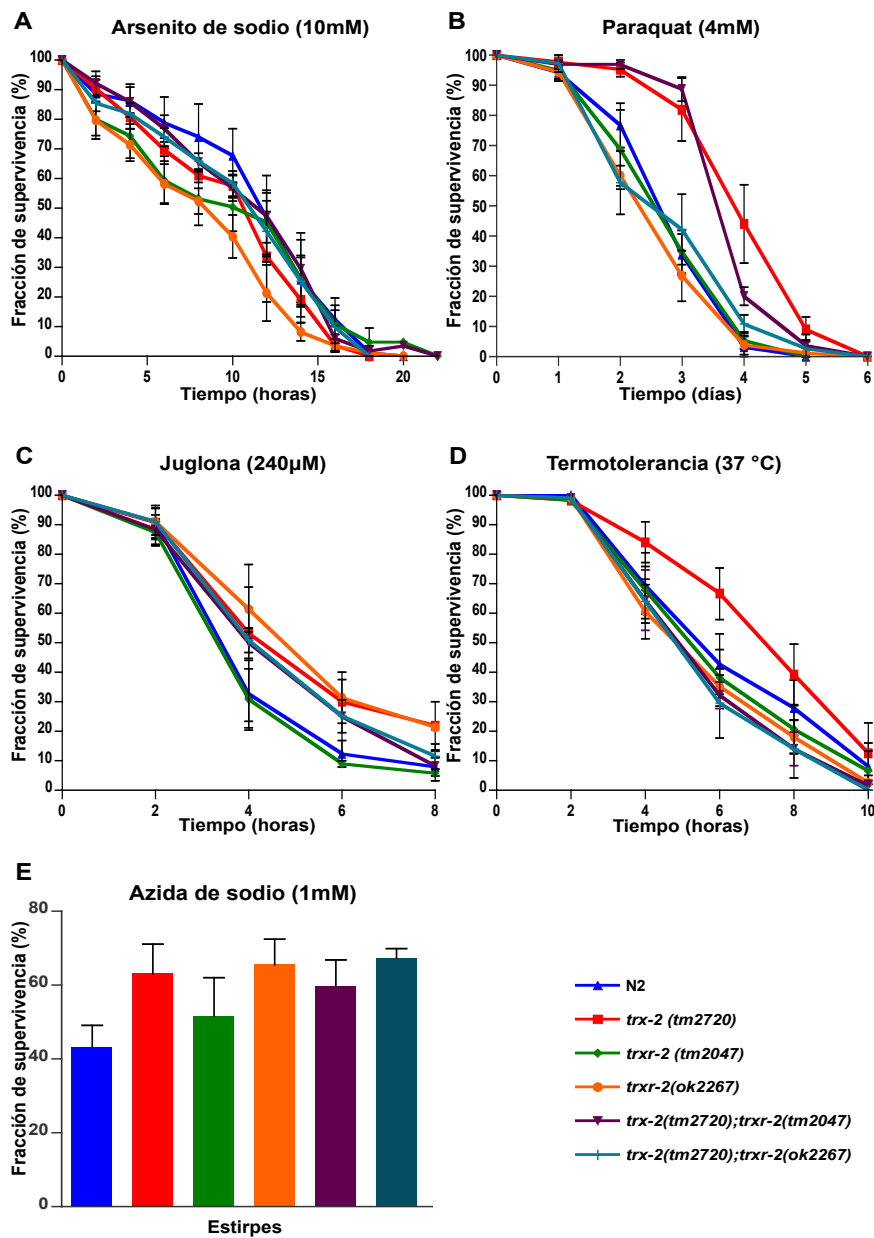


Figura 3.18 Sensibilidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial ante distintos tratamientos de estrés oxidativo. Comportamiento de la estirpe silvestre y de los mutantes simples y dobles *trx-2* y *txxr-2* frente a compuestos que inducen estrés oxidativo tales como el arsenito de sodio 10mM (A), el paraquat 4mM (B), la juglona 240 μM (C), el choque térmico 37 °C (D) y la azida de sodio 1mM (E). Cada una de las gráficas representa la media de 3-5 experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar de la media. En (A-D) se realizó ANOVA de un solo factor sin encontrar diferencias significativas en ningún caso ($P > 0.05$). En (E) $P > 0.05$ por la distribución t de student de dos colas.

El compuesto H_2 -DCF-DA es una sustancia permeable capaz de difundir a través de las membranas celulares del nematodo. Una vez dentro de las células, las esterasas intracelulares eliminan los grupos diacetato y lo convierte en un compuesto impermeable (H_2 DCF) el cual, al ser oxidado por las ERO da lugar al colorante fluorescente DCF (*Kampkötter et al., 2007*). Así pues, ante una presencia alta de ERO se observará una elevada fluorescencia y viceversa.

La cuantificación de ERO en los mutantes *trx-2* y *trx-2* simples y dobles arrojó como resultado unos niveles de producción de ERO similares a los de la estirpe silvestre tanto bajo condiciones normales de crecimiento como en la presencia de azida de sodio 1mM o de paraquat 0.8 mM (Figura 3.19).

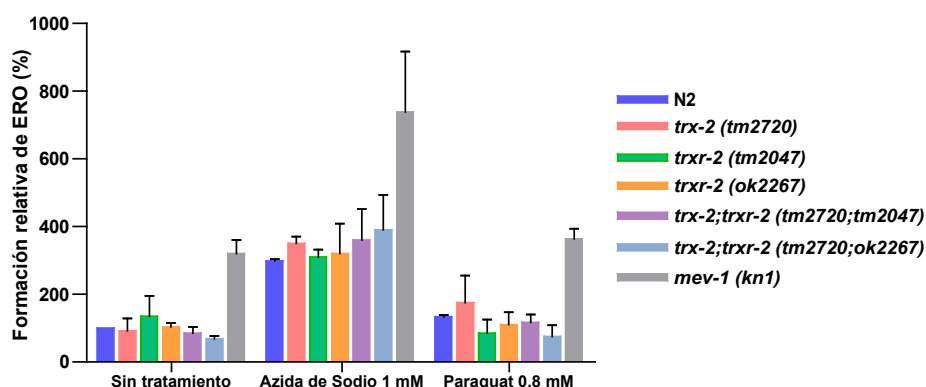


Figura 3.19 Formación relativa de ERO. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno en nematodos L4 de la estirpe silvestre y de los mutantes simples y dobles del sistema tioredoxina mitocondrial en ausencia de estrés, así como en presencia de azida de sodio 1mM y de paraquat 0.8 mM. Mutantes *mev-1(kn1)* se emplearon como control positivo debido a la elevada producción de O_2^- que presentan. Las barras de error indican el error estándar de la media. Para cada ensayo se realizó análisis ANOVA de dos factores encontrando diferencias significativas ($P < 0.001$) únicamente en el tratamiento con azida de sodio de *mev-1(kn1)* respecto a su correspondiente control silvestre.

Posteriormente, estudiamos el efecto de distintos tipos de estrés sobre la expresión de los genes *trx-2* y *trxr-2*. Así pues, animales transgénicos expresando las fusiones con GFP transcripcionales y traduccionales de ambos genes en ausencia de comida no mostraron niveles de expresión distintos a los mostrados por animales transgénicos alimentados *ad libitum*. Lo mismo ocurrió cuando los transgénicos se crecieron en presencia de azida de sodio 1 mM ó de paraquat 0.8 mM y, también cuando se sometieron a estrés térmico a 37°C.

Debido a la sorprendente falta de fenotipo de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial tanto en condiciones normales de crecimiento como bajo condiciones de estrés, quisimos evaluar si la ausencia de los genes que conforman el sistema provoca algún desajuste en la homeostasis celular del nematodo. Para ello, analizamos la modificación de los niveles de expresión y de localización subcelular, frente al tratamiento con ARNi de *trx-2* o de *trxr-2*, de los siguientes marcadores de estrés fusionados a GFP: DAF-16, factor de transcripción que en condiciones de estrés transloca del citoplasma al núcleo para regular distintos procesos biológicos incluyendo la longevidad (*Henderson y Johnson, 2001*), la resistencia al estrés térmico (*Lithgow et al., 1995*) y la resistencia al estrés oxidativo (*Honda y Honda, 1999*); SKN-1, factor de transcripción que se acumula en el núcleo de las células del intestino en respuesta a estrés oxidativo (*An y Blackwell, 2003*); SOD-3, gen que codifica a la manganeso superóxido dismutasa y cuya expresión se activa ante la acumulación de ERO (*Libina et al., 2003*); GST-4, gen inducible por la acumulación de ERO a través de la activación de *skn-1* (*Link y Johnson, 2002*) y HSP-16.2, gen que se activa como respuesta a estrés oxidativo mediado por el factor de transcripción *daf-16* (*Link et al., 1999*).

En ninguno de los animales transgénicos portadores de los marcadores anteriormente mencionados observamos cambios ni en sus niveles de expresión ni en su localización subcelular al tratarlos con ARNi de los genes *trx-2* y *trxr-2* (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Transgénicos ensayados para evaluar la inducción de estrés al silenciar los genes *trx-2* y *trxr-2* por ARNi.

Marcador	Transgen	Distribución de fluorescencia e intensidad			
		Vector vacío ARNi	<i>trx-2</i> ARNi	<i>trxr-2</i> ARNi	Control positivo de ARNi
<i>zls365</i> (Henderson y Johnson, 2001)	[<i>Pdaf-16::daf-16::GFP; rol-6</i> (<i>su1006</i>)] IV	Fluorescencia difusa en citoplasma.	Fluorescencia difusa en citoplasma.	Fluorescencia difusa en citoplasma.	<i>ins-7</i> , fuerte fluorescencia localizada en núcleo (Murphy <i>et al.</i> , 2007).
<i>Is007</i> (An y Blackwell, 2003)	[<i>Pskn-1::skn-1::GFP; rol-6</i> (<i>su1006</i>)] X	Fluorescencia débil en núcleos de células intestinales.	Fluorescencia débil en núcleos de células intestinales.	Fluorescencia débil en núcleos de células intestinales.	<i>pbs-3</i> , fluorescencia muy fuerte en los núcleos de las células del intestino (Kahn <i>et al.</i> , 2008).
<i>zcIs4</i> (Calfon <i>et al.</i> , 2002)	<i>Phsp-4::GFP V</i>	Fluorescencia débil en espermateca y extremo anterior del intestino.	Fluorescencia débil en espermateca y extremo anterior del intestino.	Fluorescencia débil en espermateca y extremo anterior del intestino.	<i>ero-1</i> , fluorescencia fuerte en la mayoría de los tejidos (Yoneda <i>et al.</i> , 2004).
<i>zcIs13</i> (Yoneda <i>et al.</i> , 2004)	<i>Phsp-6::GFP V</i>	Fluorescencia débil en el extremo posterior del intestino.	Fluorescencia débil en el extremo posterior del intestino.	Fluorescencia débil en el extremo posterior del intestino.	<i>spg-7</i> , fluorescencia fuerte en la mayoría de los tejidos (Yoneda <i>et al.</i> , 2004).
<i>dvIs70</i> (Link <i>et al.</i> , 1999)	[<i>Phsp-16.2::GFP; rol-6</i> (<i>su1006</i>)]	Aparentemente sin fluorescencia.	Aparentement e sin fluorescencia.	Aparentemente sin fluorescencia.	<i>F11A3.2</i> , fluorescencia débil en la mayoría de los tejidos (Tohyama <i>et al.</i> , 2008).
<i>mul84</i> (Libina <i>et al.</i> , 2003)	<i>Psod-3::GFP</i>	Fluorescencia débil en el extremo posterior del intestino.	Fluorescencia débil en el extremo posterior del intestino.	Fluorescencia débil en el extremo posterior del intestino.	<i>daf-2</i> , fluorescencia fuerte en el intestino (Libina <i>et al.</i> , 2003).
<i>dvIs19</i> (Link y Johnson, 2002)	<i>Pgst-4::GFP::NLS</i>	Fluorescencia moderada en las células musculares del cuerpo.	Fluorescencia moderada en las células musculares del cuerpo.	Fluorescencia moderada en las células musculares del cuerpo.	<i>pbs-3</i> , fluorescencia fuerte en la mayoría de los tejidos (Kahn <i>et al.</i> , 2008).

En conjunto, todos estos datos indican que el sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* es dispensable para mantener la homeostasis redox celular incluso bajo condiciones de estrés.

3.5.3 Papel del sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* en la respuesta a estrés de proteínas mal plegadas (UPR)

Para prevenir la agregación de las proteínas recién sintetizadas así como para favorecer su funcionamiento apropiado, las células de todos los organismos vivos han desarrollado mecanismos protectores en donde unas proteínas, llamadas chaperonas, juegan un papel fundamental al asegurar el plegamiento adecuado de estas proteínas nacientes (*Haynes y Ron, 2010; Zhang y Kaufman, 2006*).

Se ha demostrado que las tiorredoxinas, además de sus capacidades reductoras pueden comportarse como moléculas chaperonas, en algunos casos independientemente de su actividad redox, al promover el plegamiento de algunas proteínas y al aumentar la actividad de plegamiento de otras chaperonas bajo determinadas condiciones (*Berndt et al., 2008*). Por ejemplo, el sistema tiorredoxina citosólico dona electrones a las peroxirredoxinas, algunas de las cuales han sido caracterizadas como chaperonas. En este sentido, las peroxirredoxinas citosólicas Prx-1 y Prx-2 de *S. cerevisiae* y la Prx-2 humana interactúan con substratos mal plegados e incluso suprimen la degradación de la citrato sintasa por estrés térmico. También, se ha descrito en *S. cerevisiae* que el sistema tiorredoxina protege a los ribosomas de la agregación inducida por estrés (*Rand y Grant, 2006; Berndt et al., 2008*).

Asimismo, en *E. coli*, tanto la tiorredoxina como la tiorredoxina reductasa interactúan con proteínas mal plegadas y desnaturalizadas a manera y a concentraciones similares a como lo hacen las moléculas chaperonas. También se ha visto que trabajan sinérgicamente con estas chaperonas y se ha

observado que la tiorredoxina reductasa forma complejos mucho más estables con proteínas mal plegadas que la tiorredoxina (Kern *et al.*, 2003).

En *C. elegans*, se ha descrito la existencia de una maquinaria localizada en la mitocondria dedicada a promover el plegamiento adecuado de proteínas mitocondriales así como el correcto ensamblaje de complejos proteicos dentro de este orgánulo. Las chaperonas localizadas en la matriz mitocondrial, entre las que se incluye mtHSP70 y HSP-60, codificadas por los genes nucleares *hsp-6* y *hsp-60* en el nematodo, son requeridas tanto para el importe de proteínas como para facilitar el plegamiento de éstas dentro de la mitocondria. Cuando se produce algún desequilibrio en el correcto plegamiento de las proteínas mitocondriales, la respuesta a estrés de proteínas mitocondriales mal plegadas (UPR^{mit}) activa la transcripción de genes nucleares, que codifican a chaperonas mitocondriales, para promover la homeostasis proteica dentro del orgánulo (Yoneda *et al.*, 2004; Haynes y Ron, 2010).

Así pues, para detectar si la deficiencia de alguno de los genes *trx-2* ó *txxr-2* es capaz de afectar a la UPR^{mit} utilizamos una estirpe transgénica que expresa la fusión transcripcional *hsp-6::GFP*, la cual en condiciones normales posee una expresión basal en el extremo posterior del intestino pero que aumenta significativamente en la mayoría de los tejidos cuando se induce estrés mitocondrial o cuando se realiza el silenciamiento de factores requeridos para la expresión del ADN mitocondrial o de chaperonas y proteasas propias del orgánulo (Yoneda *et al.*, 2004).

Los transgénicos expresando *hsp-6::GFP* fueron tratados con ARNi de *trx-2* ó de *txxr-2* y observamos que el silenciamiento de éstos genes no activa la UPR^{mit} (Figura 3.20 y Tabla 3.4). Sin embargo, cuando se realizó ARNi de algunos genes que activan la UPR^{mit} tales como la proteasa mitocondrial *spg-7* (Yoneda *et al.*, 2004), el componente del complejo prohibitina *phb-2* implicado en el ensamblaje de componentes de la cadena respiratoria (Artal-sanz *et al.*,

2003) o la chaperona mitocondrial *hsp-6*, se observó un aumento significativo en la expresión de los genes *trx-2* y *trxr-2* a través de los transgénicos expresando sus respectivas fusiones transcripcionales y traduccionales (Figura 3.21). Estos datos sugieren que el sistema tiorredoxina mitocondrial del nematodo forma parte de la maquinaria molecular que se activa tras la inducción de la UPR^{mit}.

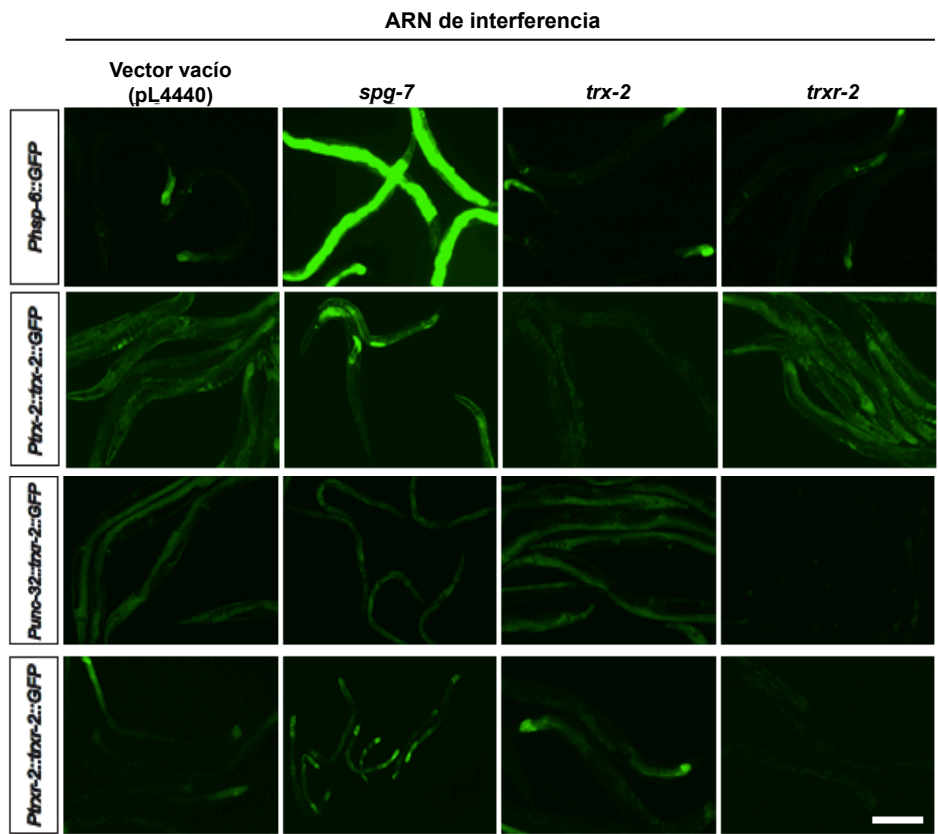


Figura 3.20 No inducción de la UPR^{mit} ante el silenciamiento del sistema tiorredoxina mitocondrial. Animales transgénicos expresando las fusiones transcripcionales o traduccionales a GFP de los genes *trx-2*, *unc-32*, *trxr-2* y *hsp-6*, sometidos a ARNi de los genes *trx-2*, *trxr-2* y *spg-7*. El ARNi del gen *spg-7* fue empleado como control positivo de inducción de la UPR^{mit}. En las imágenes se observa que los tratamientos con ARNi de los genes *trx-2* y *trxr-2* silencian de manera eficiente a sus respectivos transgenes. Cada una de las fotografías del mismo transgénico fueron capturadas empleando ajustes idénticos de brillo, contraste y tiempo de exposición. Posteriormente, y en caso de ser necesario, las imágenes correspondientes a una misma fila fueron modificadas en niveles iguales de brillo y contraste en Adobe Photoshop La barra blanca indica la escala a 200 μ m.

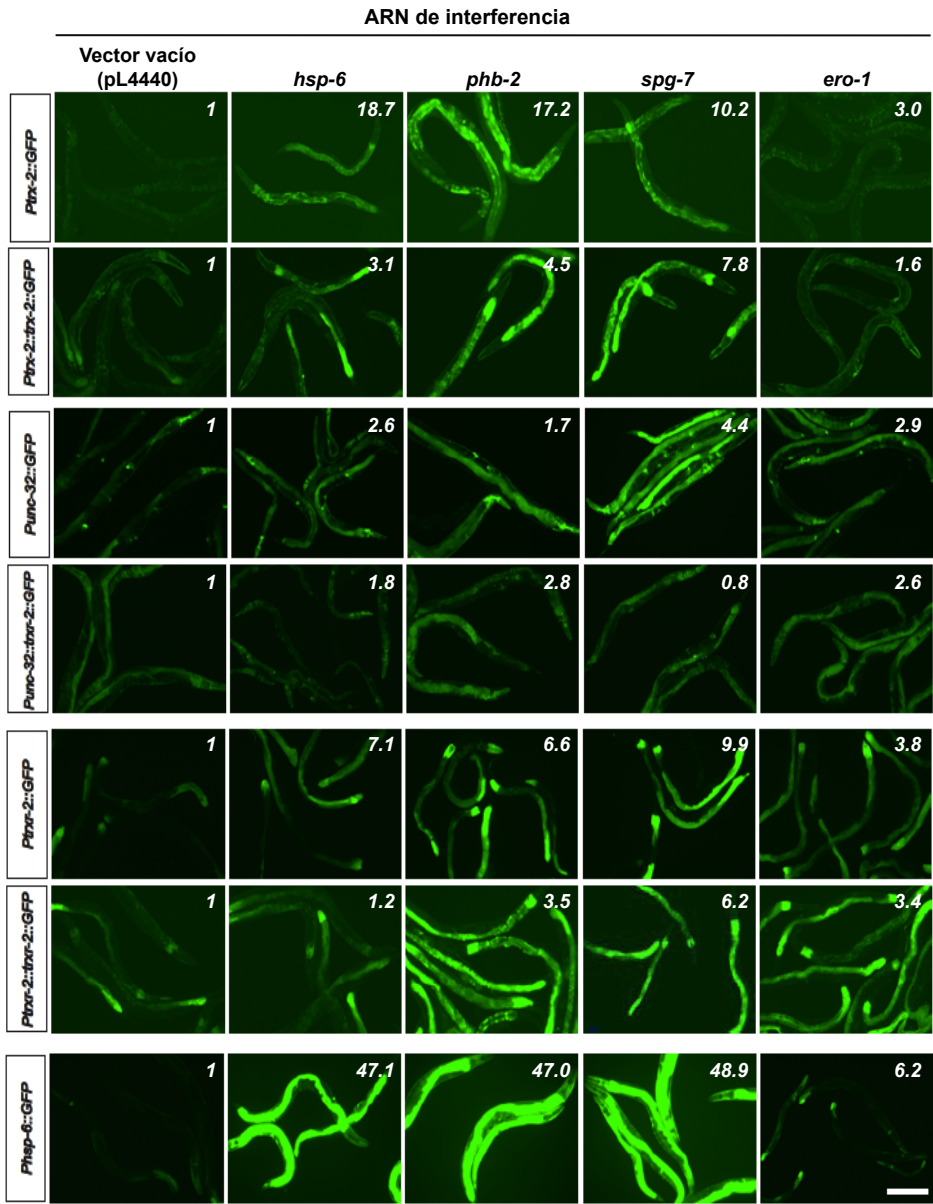


Figura 3.21 Inducción de la expresión del sistema tiorredoxina mitocondrial dependiente de la activación de la $UPR^{mit\ 2}$.

Cabe mencionar que la expresión de TRX-2 bajo estas condiciones de estrés no se limita únicamente a las neuronas AIYL/R y ASEL y a las células musculares, según se trate de las estirpes transgénicas expresando las fusiones transcripcionales o traduccionales, sino que ésta también aumenta significativamente en las células del intestino en ambos casos, mostrando un patrón que no se observa bajo condiciones no estresantes.

Como control negativo de activación de la UPR^{mit} usamos ARNi de *ero-1*, una oxidorreductasa de retículo endoplásmico (RE) cuya represión activa específicamente a la UPR de dicho orgánulo (UPR^{RE}) (Yoneda et al., 2004). Sorprendentemente, al usar el ARNi de *ero-1* sobre las estirpes transgénicas del sistema tiorredoxina mitocondrial observamos un inesperado aumento de la expresión de *trx-2*, de *trx-2* e incluso de *Phsp-6::GFP* (Figura 3.21).

Estos resultados refuerzan la idea de una comunicación cruzada entre la mitocondria y el retículo endoplásmico (de Brito y Scorrano, 2010) y además, sugieren que el sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* podría formar parte de este sistema de respuesta coordinado ante perturbaciones en la homeostasis proteica celular.

²Animales transgénicos expresando las fusiones transcripcionales o traduccionales con GFP de los genes *trx-2*, *unc-32* y *trx-2* sometidos a ARNi de genes que inducen la respuesta UPR^{mit} (*hsp-6*, *phb-2* y *spg-7*) o UPR^{RE} (*ero-1*). Nematodos transgénicos expresando la construcción *Phsp-6::GFP* se emplearon como control positivo de inducción de la UPR^{mit}. Cada una de las fotografías del mismo transgénico fueron capturadas empleando ajustes idénticos de brillo, contraste y tiempo de exposición. Posteriormente, y en caso de ser necesario, las imágenes correspondientes a una misma fila fueron modificadas en niveles iguales de brillo y contraste en Adobe Photoshop. La cuantificación de la expresión de GFP se realizó con el programa de análisis de imagen ImageJ. Los valores de expresión se muestran en la esquina superior derecha de cada fotografía. La media de la fluorescencia de 5 a 10 nematodos por tratamiento (ARNi) se dividió entre el área seleccionada (región intestinal completa). Los valores de fluorescencia de cada uno de los transgénicos en ARNi del vector vacío se normalizaron a 1, por lo que las cantidades de los demás tratamientos indican la proporción de inducción en comparación a su correspondiente control. La barra blanca indica la escala de 200 µm.

3.5.4 Longevidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial

El papel de la mitocondria en el proceso de envejecimiento celular es un tema de gran importancia debido a que la mayor parte de las ERO intracelulares provienen de la cadena transportadora de electrones residente en este orgánulo. Por tal motivo, tanto las proteínas como los lípidos y el ADN mitocondriales se encuentran particularmente expuestos al daño oxidativo, que en exceso puede generar una disfunción mitocondrial asociada directamente con el envejecimiento y con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Finkel y Holbrook, 2000; Lanza y Nair, 2009).

En *C. elegans*, la relación que existe entre la longevidad y las especies reactivas de oxígeno se ha examinado en algunos mutantes longevos que también han resultado ser resistentes a algunas formas de estrés oxidativo. Por ejemplo, la primera vez que se demostró tal relación fue en mutantes longevos *age-1*, los cuales manifestaron un incremento en la actividad superóxido dismutasa (SOD) y en la actividad catalasa conforme envejecían. Así mismo, estos mutantes presentaron una resistencia frente al H₂O₂ relativa a la edad que concuerda con el aumento de las actividades catalasa y SOD previamente observadas (Larsen, 1993). El aumento en la actividad catalasa y SOD también ocurre en mutantes *eat-2*, en los cuales además existe una elevada expresión del ARNm de los genes *sod-1*, *sod-2*, *sod-4* y *sod-5* (Van Raamsdonk y Hekimi, 2010).

Otra de las aproximaciones realizadas para estudiar la relación entre las ERO y el envejecimiento ha sido el originar un descenso de las defensas antioxidantes, mediante el silenciamiento o delección de genes que codifiquen a proteínas involucradas en este proceso. En este sentido, el sistema tiorredoxina también ha demostrado su implicación en la longevidad, ya que se ha visto que ratones transgénicos sobreexpresantes de la TRX-1 humana son más longevos (Mitsui et al., 2002; Pérez et al., 2011). Por el contrario, se ha

observado que la vida media y la vida máxima de *C. elegans* desciende en mutantes nulos *trx-1*, mientras que su sobreexpresión, al igual que en ratones, incrementa la vida media del nematodo (Miranda-Vizuite et al., 2006).

Diversos estudios han señalado que el grupo más representativo de genes que modifican la longevidad en *C. elegans* está constituido por aquellos que afectan de alguna manera la función mitocondrial. Así, mutaciones puntuales en varios genes que actúan directamente en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones aumentan (*clk-1*, *isp-1* y *nuo-6*), o disminuyen (*mev-1*, *nuo-1*, *gas-1*) considerablemente la vida del nematodo (Lee et al., 2003; Rea et al., 2007; Van Raamsdonk y Hekimi, 2010).

Así pues, dada la importancia que tiene la mitocondria en el proceso de envejecimiento y la implicación de otros sistemas tiorredoxina en la longevidad, pensamos que el sistema tiorredoxina mitocondrial podría influir en la regulación de la longevidad del nematodo. Sin embargo, los ensayos de longevidad realizados en los mutantes simples y dobles del sistema tiorredoxina mitocondrial tanto a 20 como a 25 °C no revelaron diferencias significativas al comparar los niveles de vida media y de vida máxima de dichos mutantes con la estirpe silvestre N2 (Figura 3.22).

La ruta de señalización de la insulina/IGF-1 (IIS) es una de las vías principales que controlan la longevidad no sólo del nematodo sino también de otros organismos modelo tales como *S. cerevisiae*, *Drosophila* o mamíferos (Barbieri et al., 2003; Kenyon, 2010). De esta manera, una disminución de la señalización de la ruta de la insulina por mutaciones en el gen *daf-2*, el cual codifica al único receptor de insulina en *C. elegans*, aumenta la longevidad de los nematodos (Kaletsky y Murphy, 2010; Kenyon et al., 1993) y su resistencia a condiciones de estrés tales como el estrés térmico (Lithgow et al., 1995) y el estrés oxidativo (Honda y Honda, 1999). Por el contrario, mutaciones en el gen *daf-16*, el cual codifica a un factor de transcripción tipo FOXO que se encuentra

genéticamente aguas abajo en la ruta de la insulina, suprimen tales efectos (Barbieri *et al.*, 2003; Mukhopadhyay y Tissenbaum, 2006; Kenyon, 2010).

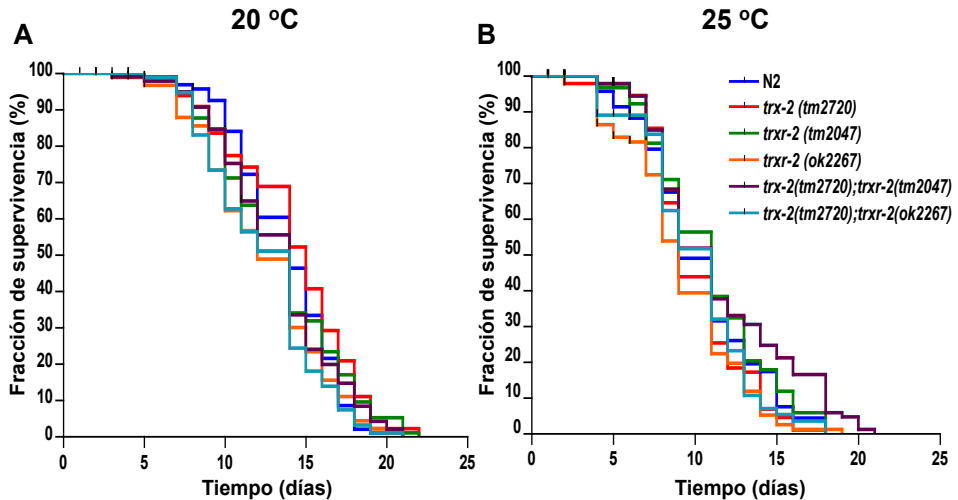


Figura 3.22 Análisis de la longevidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial. El efecto en la longevidad de los mutantes simples y dobles *trx-2* y *trx-2* fue ensayado a 20 °C (A) y a 25 °C (B). Las curvas de longevidad fueron creadas por el método de Kaplan-Meier. Cada uno de los ensayos se realizó dos veces obteniendo resultados similares, por lo que las gráficas muestran un experimento representativo. El rango de supervivencia de cada estirpe fue comparado con el de la estirpe silvestre N2 usando el método del log-rank (Mantel-Cox) test sin obtener diferencias significativas en ningún caso.

Dado que TRX-1 en *C. elegans* regula diversos aspectos de la señalización por la vía de la insulina (Fierro-González *et al.*, 2011), quisimos evaluar si la ausencia del sistema tiorredoxina mitocondrial afecta a la longevidad de los mutantes *daf-2* y *daf-16* involucrados en esta ruta.

Sin embargo, como se muestra en la figura 3.23, las longevidades de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial en fondos genéticos *daf-2* (*e1370*) ó *daf-16* (*mu86*) a 25 °C no mostraron ninguna diferencia significativa con respecto a los mutantes simples *daf-2* (*e1370*) y *daf-16* (*mu86*).

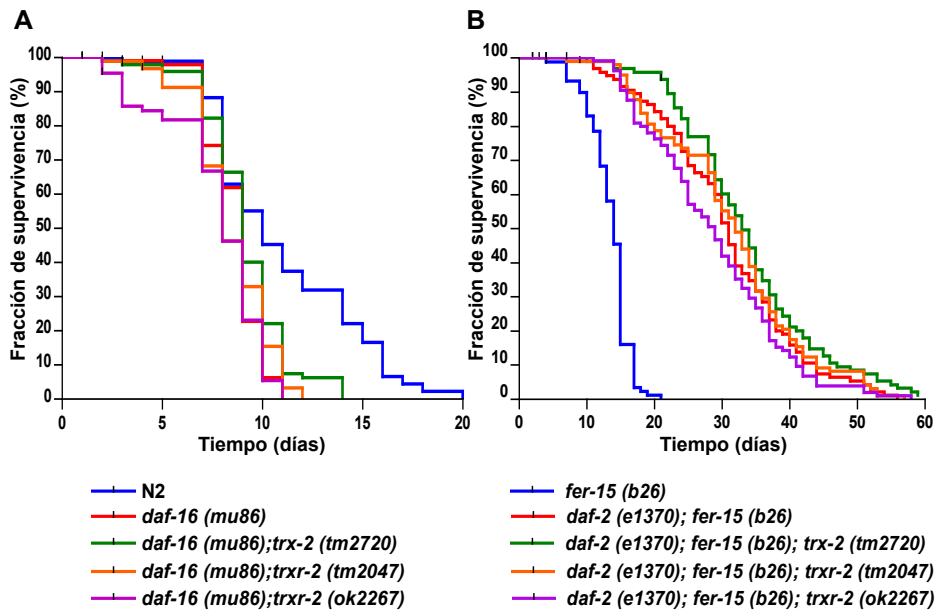


Figura 3.23 Análisis de la longevidad de los mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial en fondos genéticos *daf-16* y *daf-2*. El efecto de los fondos genéticos *daf-16 (mu86)* (A) y *daf-2 (e1370)* (B) en la longevidad de los mutantes *trx-2* y *trx-2* fue ensayado a 25 °C. La mutación *fer-15 (b26)* fue incluida en los mutantes que contienen la delección *daf-2 (e1370)* para prevenir la eclosión interna de la progenie que presenta dicho alelo. Las curvas de longevidad fueron creadas por el método de Kaplan-Meier. Cada uno de los ensayos se realizó dos veces obteniendo resultados similares, por lo que las gráficas muestran un experimento representativo. El rango de supervivencia de cada estirpe fue comparado con el del mutante simple *daf-16 (mu86)* en (A) o con el del mutante *daf-2 (e1370); fer-15 (b26)* en (B) usando el método del log-rank (Mantel-Cox) test sin obtener diferencias significativas en las estirpes que contienen a los alelos de los genes *trx-2* y *trx-2*.

3.5.5 El sistema tiorredoxina mitocondrial en modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans*

Como se ha venido mencionando a lo largo de este trabajo, una apropiada función mitocondrial es esencial para el buen funcionamiento de la célula no sólo porque es fundamental para la generación de energía, sino también porque la mitocondria es la fuente principal de producción de ERO. La disfunción mitocondrial y la elevada producción de ERO se han relacionado con el envejecimiento y con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas

debido a la acumulación tanto de mutaciones en el ADN mitocondrial como de proteínas modificadas por oxidación (*Finkel y Holbrook, 2000*).

Las proteínas modificadas por oxidación suelen ser termodinámicamente inestables y tienden a formar estructuras terciarias mal plegadas que inmediatamente promueven su agregación. En este sentido, el control de la agregación de proteínas modificadas por oxidación es crítico para el mantenimiento de la proteostasis u homeostasis proteica celular (*Kirstein-Miles y Morimoto, 2010*) cuya alteración ha sido claramente implicada en muchas enfermedades neurodegenerativas (*Squier, 2001*). Así, para mantener la proteostasis celular es necesario que los sistemas antioxidantes trabajen de manera eficiente para evitar que las ERO oxiden a las proteínas y que las chaperonas moleculares sean eficaces para evitar la agregación proteica. Estudios recientes han demostrado que la vía de la insulina/IGF-1 además de regular el proceso del envejecimiento, también está involucrada en la regulación de la homeostasis de proteínas, sugiriendo especialmente que las actividades que protegen contra la proteotoxicidad disminuyen con la edad (*Cohen et al., 2010*).

El hecho de descubrir que la expresión de TRX-2 y de TRXR-2 se induce cuando la UPR^{mit} es activada, nos llevó a investigar si estos genes desempeñan un papel importante en el proceso de agregación de proteínas y en la proteotoxicidad. Para tal propósito, decidimos usar dos modelos de *C. elegans* de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento que cursan con un claro componente de agregación proteica. Primeramente utilizamos una estirpe transgénica que expresa en las células musculares del nematodo la proteína humana α -sinucleína fusionada a YFP, la cual agrega en el citoplasma de dichas células conforme el animal envejece (*van Ham et al., 2008*). La α -sinucleína es una proteína de función desconocida que se ha implicado en la progresión de la enfermedad de Parkinson y que se caracteriza por la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del

cerebro (*Spillantini et al., 1997*). En los pacientes de Parkinson, la α -sinucleína se acumula en agregados denominados Cuerpos de Lewis, siendo dichos agregados una de las características patológicas de esta enfermedad (*Spillantini y Goedert, 2000*).

Como se muestra en la figura 3.24, la fusión α -sinucleína::YFP agrega en el citoplasma de las células musculares de nematodos N2 conforme el animal envejece. Cuando la fusión α -sinucleína::YFP se expresa en mutantes simples y dobles *trx-2* y *trxr-2*, no se observa ninguna diferencia significativa respecto al control silvestre en el patrón temporal de agregación o en la distribución subcelular de los agregados durante el crecimiento de los nematodos a 20 °C (Figura 3.24) o 25 °C (datos no mostrados).

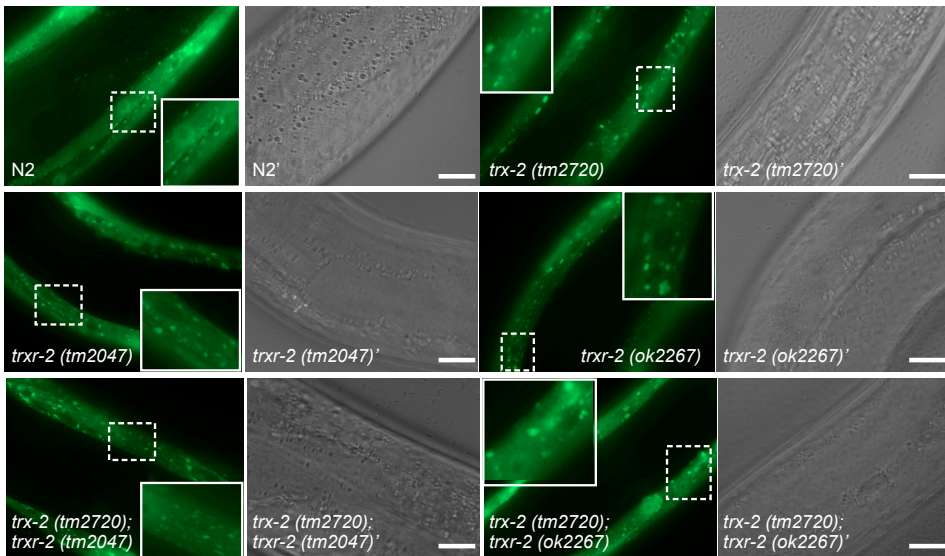


Figura 3.24 Patrón de agregación de α -sinucleína::YFP en mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial. La estirpe silvestre N2 y los mutantes simples y dobles *trx-2* y *trxr-2* expresando la construcción *Punc-54::* α -sinucleína::YFP fueron examinados para detectar diferencias en la agregación de la proteína α -sinucleína::YFP en el citoplasma de las células musculares del nematodo. La cantidad, tamaño, distribución y morfología de los agregados α -sinucleína::YFP fueron similares en todas las estirpes examinadas. Los insertos en cada una de las imágenes muestran la amplificación de su respectiva zona marcada. La barra blanca indica la escala de 20 μ m.

Seguidamente, procedimos a evaluar el papel del sistema tiorredoxina mitocondrial en un modelo de la enfermedad de Alzheimer en el nematodo. Para ello, usamos la estirpe transgénica CL2006 que expresa el péptido β -amiloide humano en las células musculares del nematodo, a partir del *array* integrado *dvl2* (ver lista de estirpes en sección 6.1.1), resultando en un fenotipo de parálisis progresiva como consecuencia de la agregación intracelular del péptido A β conforme el animal envejece (*Link, 1995*). El péptido A β es el componente primario de las placas amiloides presentes en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y, es un polipéptido formado de entre 39 y 42 aminoácidos que deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP), la cual es una proteína transmembranal con función biológica desconocida (*Meredith, 2005; Smith et al., 2007*).

Al silenciar el gen *trx-2* por ARNi en nematodos CL2006 (*dvl2*), el patrón de parálisis no se modificó significativamente con respecto al control sin silenciar (Figura 3.25). Este resultado se confirmó posteriormente cuando se expresó el péptido A β en mutantes *trx-2* (*tm2720*) (datos no mostrados).

Por el contrario, cuando se silenció el gen *txr-2* mediante ARNi en nematodos CL2006 (*dvl2*), se observó un aumento significativo y reproducible en el patrón de parálisis con respecto al control sin silenciar (Figura 3.25). Además, y a diferencia de los mutantes *trx-2* (*tm2720*), fue imposible obtener animales expresando el péptido A β , a partir del *array* integrado *dvl2*, en fondos genéticos mutantes *txr-2* (*tm2047*) o *txr-2* (*ok2267*).

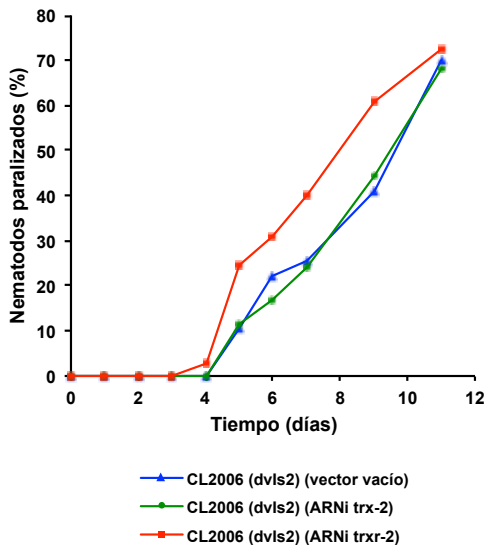


Figura 3.25 Cuantificación de la parálisis de nematodos CL2006 (*dvls2*) en ARNi de *trx-2* y de *trxr-2*. Cuando nematodos CL2006 (*dvls2*) son tratados con ARNi de *trx-2* no se observa diferencia en los niveles de parálisis con respecto al control. Sin embargo, cuando se silencia el gen *trxr-2* por ARNi la parálisis aumenta significativamente. El número de nematodos paralizados se cuantificó diariamente hasta el día 11, el día 0 indica el día de puesta de huevos. El porcentaje de nematodos paralizados en ARNi de *trx-2* y *trxr-2* se comparó con el de nematodos paralizados creciendo en el ARNi control (vector vacío). La gráfica muestra un experimento representativo de dos ensayos independientes.

No obstante, sí logramos obtener nematodos expresando el péptido A β en fondos mutantes *trxr-2* cuando hicimos uso de las estirpes transgénicas CL2120 y CL2750 (ver lista de estirpes en sección 6.1.1), las cuales expresan el péptido A β a partir de los *arrays* integrados *dvls14* y *dvls100* respectivamente. Por tanto, con estos nematodos pudimos confirmar que, mutantes *trxr-2* recapitulan el aumento de parálisis dependiente de A β inicialmente identificado mediante ARNi (Figura 3.26A).

Para descartar que las variaciones en el contenido de A β de nematodos CL2006, CL2120 y CL2750 estuvieran determinando la letalidad que ocurre entre animales CL2006 (*dvls2*) y los fondos genéticos *trxr-2* (*tm2047*) o *trxr-2* (*ok2267*), examinamos los niveles totales de A β en estas tres estirpes y, encontramos que CL2006 (*dvls2*) expresa cantidades ligeramente superiores de A β en comparación con CL2120 (*dvls14*) y CL2750 (*dvls100*) (Figura 3.26B).

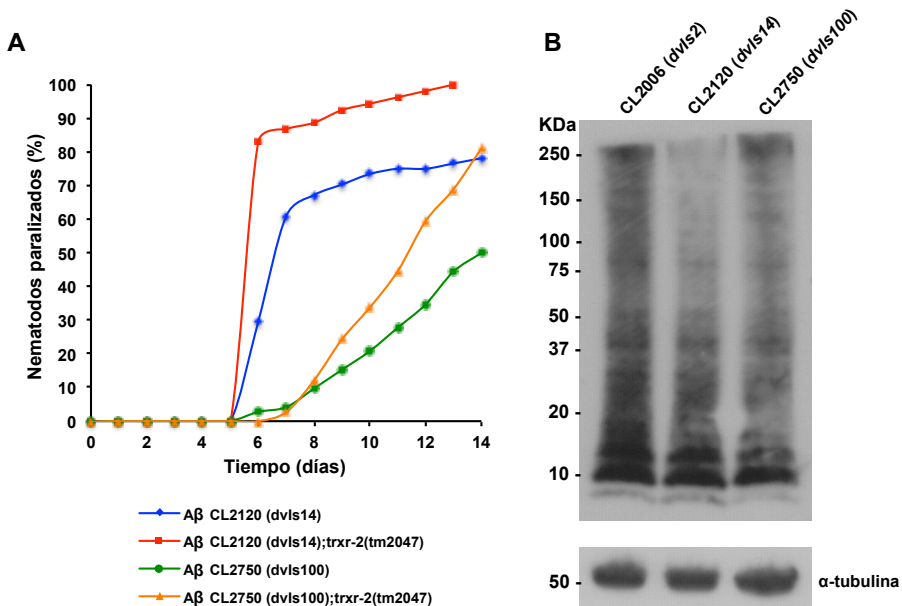


Figura 3.26 Cuantificación de la parálisis en nematodos CL2120 (*dvls14*) y CL2750 (*dvls100*) con fondo mutante *trxr-2* y contenido total de Aβ. (A) El efecto del aumento de la parálisis en fondo mutante *trxr-2* fue verificado en las estirpes CL2120 (*dvls14*) y CL2750 (*dvls100*) con el alelo *tm2047*. Los nematodos fueron crecidos en OP50 y la parálisis fue determinada a 20 °C. El número de nematodos paralizados se cuantificó diariamente hasta el día 14, el día 0 indica el día de puesta de huevos. La gráfica muestra los datos de un experimento representativo. (B) Western blot con extractos de proteína total de nematodos Aβ usando el anticuerpo monoclonal anti-Aβ 6E10. Todos los carriles fueron cargados con extractos provenientes de 100 nematodos sincronizados, de un día de adultos, crecidos en OP50 a 20 °C. Como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-α-tubulina.

Ante este resultado, concluimos que el sitio de inserción del *array dvls2* en el genoma de la estirpe CL2006 es la causa más probable de la letalidad en nematodos homocigotos *trxr-2*; sin embargo, no podemos descartar por completo que la pequeña diferencia en su contenido total de Aβ también juegue un papel significativo en dicha letalidad.

Dado que el fenotipo de aumento de parálisis descrito al silenciar o delecionar el gen *trxr-2* se ha llevado a cabo en nematodos transgénicos que expresan el péptido Aβ humano de forma constitutiva (CL2006, CL2120 y CL2750), nos preguntamos si el efecto protector que ejerce *trxr-2* es una consecuencia de su

requerimiento durante la embriogénesis y desarrollo temprano, o sea, cuando las células musculares se están generando (*Sulston, 1983; Sulston y Horvitz, 1977*), o si también puede ser implementado en etapas de desarrollo más tardías, es decir, cuando las células musculares están completamente formadas. Para responder a esta pregunta utilizamos a la estirpe CL4176 (ver lista de estirpes en sección 6.1.1), la cual expresa al péptido A β humano de manera inducible desde el *array* integrado *dvIs27*. En estos nematodos, la producción de A β se induce mediante un aumento de temperatura a 23 o 25 °C en el estadio larvario L3, estadio en el cual todas las células musculares ya se han formado (*Link et al., 2003*).

Nuestros resultados muestran que *trxr-2* también protege contra la parálisis incluso cuando A β es producido de forma inducible (Figura 3.27), indicando que el efecto protector de *trxr-2* en la parálisis dependiente de A β está asociada a la función muscular pero no a su biogénesis.

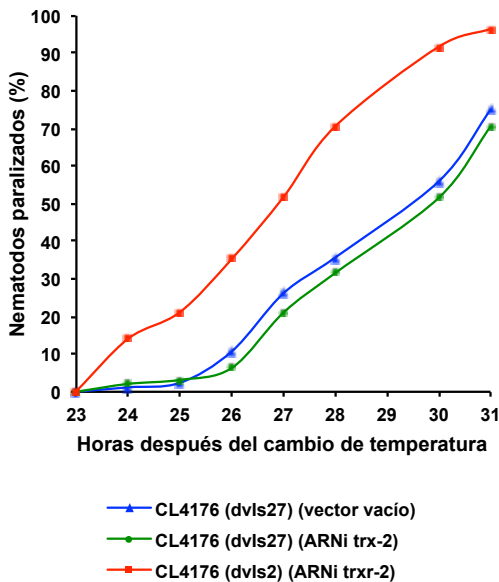


Figura 3.27 Cuantificación de la parálisis de nematodos CL4176 (*dvIs27*) en ARNi de *trx-2* y de *trxr-2*. Cuando nematodos CL4176 (*dvIs27*) son tratados con ARNi de *trx-2* no se observan diferencias en los niveles de parálisis con respecto al control. Sin embargo, cuando se silencia el gen *trxr-2* por ARNi la parálisis aumenta significativamente. El número de nematodos paralizados se cuantificó cada hora, 23 horas después del cambio de temperatura de 16 a 23 °C. El porcentaje de nematodos paralizados en ARNi de *trx-2* y *trxr-2* se comparó con el de nematodos paralizados creciendo en el ARNi control (vector vacío). La gráfica muestra un experimento representativo de dos ensayos independientes con resultados similares.

Si la falta o ausencia de *trxr-2* aumenta el fenotipo de parálisis dependiente de A β , nos preguntamos si la sobreexpresión de TRXR-2 reduciría los niveles de parálisis. Para tal propósito, generamos transgénicos sobreexpresando niveles elevados de TRXR-2 en las células musculares de nematodos A β constitutivos CL2006 (*dvIs2*) e inducibles CL4176 (*dvIs27*) (Figura 3.28A). Contrariamente a lo esperado, la sobreexpresión de TRXR-2, desde los *arrays* extracromosomales *vzEx71* en CL2006 (*dvIs2*) y *vzEx111* en CL4176 (*dvIs27*), no modificó los niveles de parálisis en relación a los correspondientes controles (Figuras 3.28B y C).

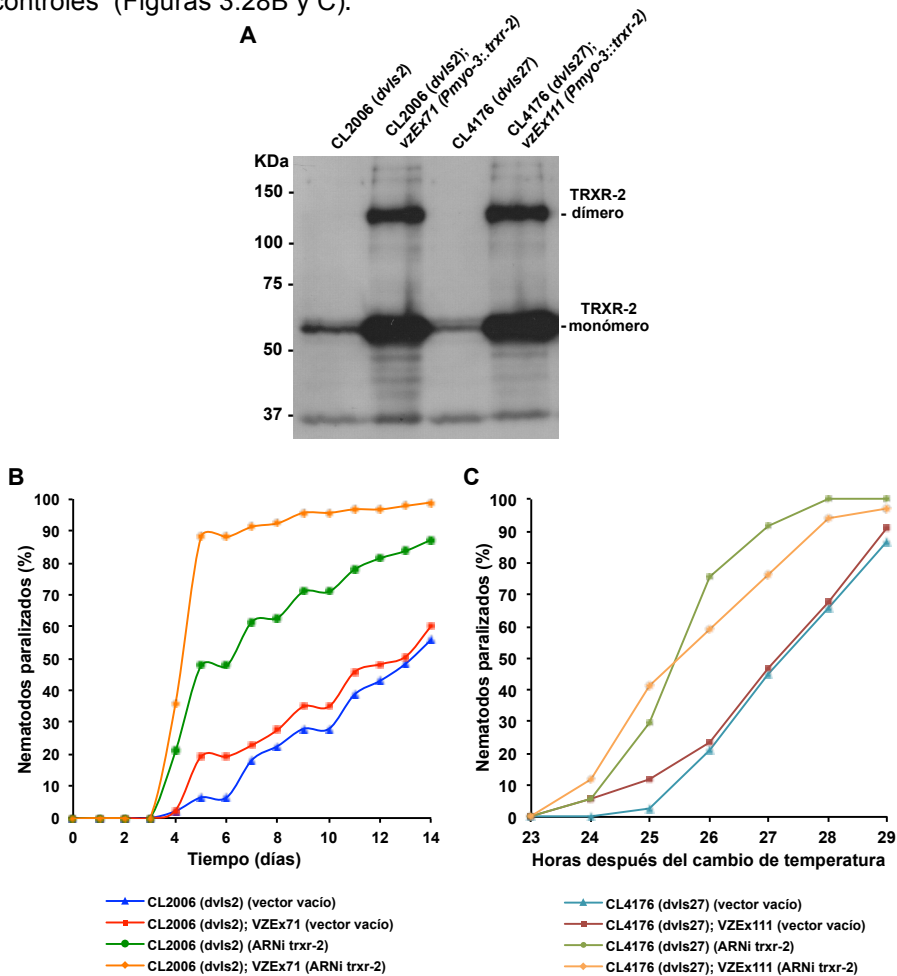


Figura 3.28 Cuantificación de la parálisis en nematodos CL2006 (*dvIs2*) y CL4176 (*dvIs27*) con sobreexpresión de TRXR-2.³

A continuación, para determinar si el efecto de TRXR-2 en el fenotipo de parálisis está asociado con diferencias en la cantidad total, agregación u oligomerización del péptido β -amiloide, primeramente realizamos ensayos de western blot con nematodos CL2006 (*dvIs2*) de 1 día de adultos (momento en el que se inicia la parálisis) usando el anticuerpo monoclonal anti-A β 6E10. Como se observa en la figura 3.29A, la cantidad de A β total no se ve aumentada significativamente cuando los nematodos CL2006 (*dvIs2*) son tratados con ARNi de *trxr-2*, a excepción de un ligero incremento que se aprecia en el rango de 75 a 250 kDa de las formas oligoméricas de A β . Sin embargo, un resultado totalmente inesperado fue que los niveles de A β disminuyesen enormemente en aquellos transgénicos que sobreexpresan TRXR-2, efecto que es suprimido cuando éstos son tratados con ARNi de *trxr-2* (Figura 3.29A).

Igualmente, se obtuvieron resultados bastante similares con los nematodos A β inducibles CL4176 (*dvIs27*), aunque la reducción de A β en nematodos sobreexpresando TRXR-2 no fue tan fuerte como en la estirpe constitutiva CL2006 (*dvIs2*) (Figura 3.29B). Esta diferencia de reducción de A β entre la estirpe constitutiva y la estirpe inducible podría ser debida a la saturación que sufren los mecanismos de degradación de A β , por la rápida inducción y los altos niveles que se producen del péptido, tras el cambio de temperatura al que se somete la estirpe inducible.

³(A) Western blot anti-TRXR-2. Todos los carriles fueron cargados con extractos de proteína total de 100 nematodos sincronizados, de 1 día de adultos, crecidos en OP50 a 16 °C. (B) Parálisis progresiva de nematodos CL2006 (*dvIs2*) sobreexpresando TRXR-2 a través del array extracromosomal *vzEx71* y de nematodos CL2006 (*dvIs2*) no sobreexpresantes, ambos crecidos en ARNi de *trxr-2* o en ARNi control (vector vacío). La parálisis fue determinada a 20 °C. El número de nematodos paralizados se cuantificó diariamente hasta el día 14, el día 0 indica el día de puesta de huevos. (C) Parálisis progresiva de nematodos CL4176 (*dvIs27*) sobreexpresando TRXR-2 a través del array extracromosomal *vzEx111* y de nematodos CL4176 (*dvIs27*) no sobreexpresantes, ambos crecidos en ARNi de *trxr-2* o en ARNi control (vector vacío). La parálisis fue determinada cada hora después de 23 horas de inducción de A β a 25 °C. Las gráficas en (B) y (C) muestran un experimento representativo de dos ensayos independientes.

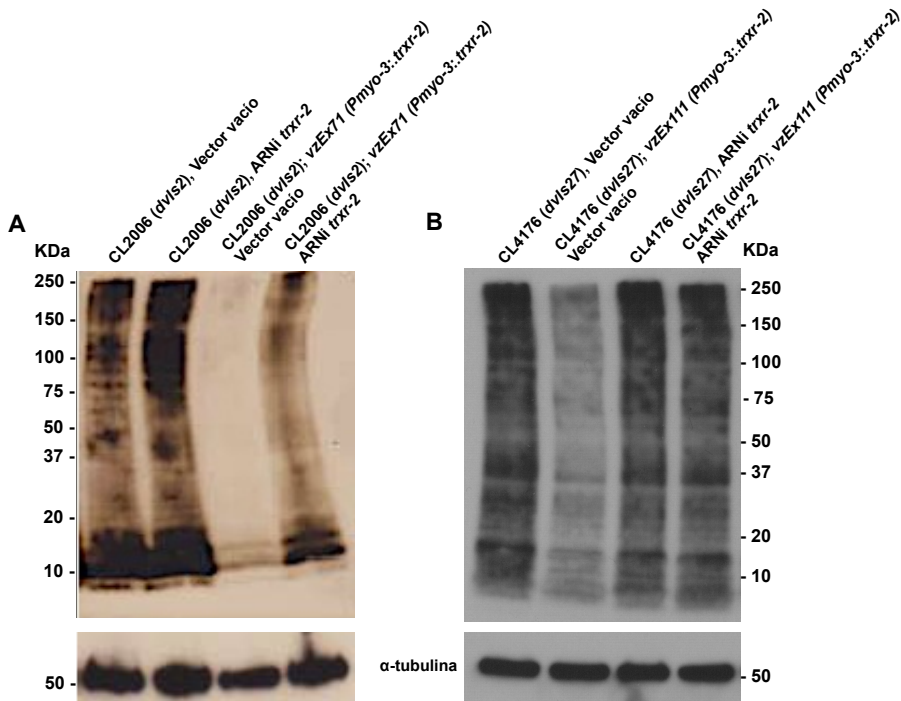


Figura 3.29 Contenido total de A β de nematodos CL2006 (*dvlS2*) y CL4176 (*dvlS27*) con sobreexpresión de TRXR-2. Western blot usando el anticuerpo monoclonal anti-A β 6E10 en extractos de proteína total de nematodos A β constitutivos (A) e inducibles (B) y sus respectivos transgénicos sobreexpresando TRXR-2. Cada una de las estirpes fueron tratadas con ARNi control (vector vacío) o con ARNi del gen *trxr-2*. Todos los carriles fueron cargados con extractos de proteína total proveniente de 100 nematodos sincronizados; en (A), de 1 día de adultos y crecidos a 20 °C, y en (B), tras 24 horas de inducción de A β a 23 °C. Como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina.

Finalmente, realizamos ensayos de inmunohistoquímica en nematodos CL2006 (*dvlS2*) empleando, por un lado, el anticuerpo específico contra el péptido β -amiloides 6E10 (que detecta depósitos amiloides, agregados amorfs, oligómeros, monómeros y A β soluble), y por el otro, el colorante vital específico de depósitos β -amiloides X-34 (Link et al., 2001). Con esta aproximación confirmamos de forma adicional los resultados obtenidos con los western blot, ya que no se encontraron diferencias en las cargas totales de A β o en la formación de depósitos amiloides entre el control y nematodos tratados con ARNi de *trxr-2* (Figura 3.30A). No obstante, sí se observaron cambios en

nematodos CL2006 (*dvls2*) sobreexpresando TRXR-2 al mostrar un considerable descenso en el contenido total de A β , así como una importante reducción en la formación de depósitos amiloides (Figura 3.30B).

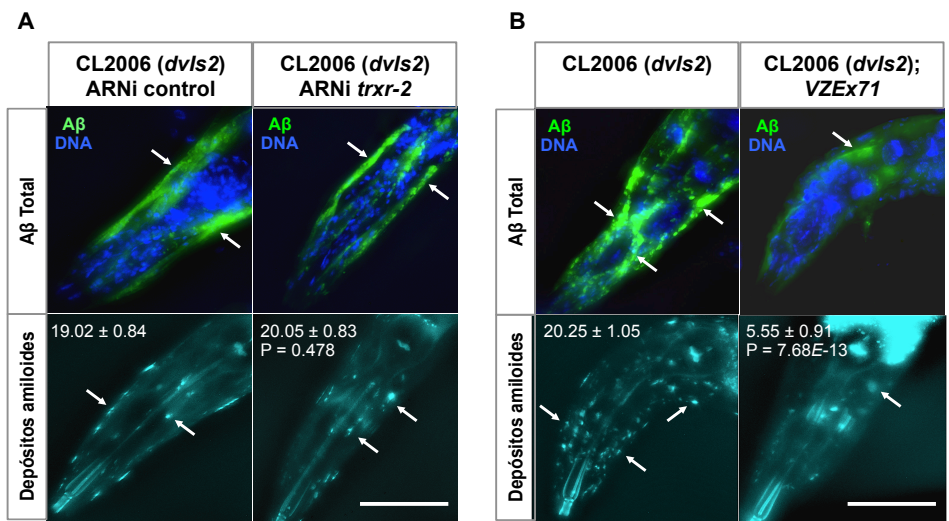


Figura 3.30 Formación de agregados y depósitos β -amiloides. (A) Detección por inmunohistoquímica del contenido total de A β (imágenes superiores y flechas) y de depósitos amiloides (imágenes inferiores y flechas) en la zona de los músculos de la cabeza de nematodos de un día de adultos CL2006 (*dvls2*) crecidos en ARNi control o en ARNi de *trxr-2*. (B) Detección por inmunohistoquímica del contenido total de A β (imágenes superiores y flechas) y de depósitos amiloides (imágenes inferiores y flechas) en la zona de los músculos de la cabeza, de nematodos de un día de adultos CL2006 (*dvls2*) y CL2006 (*dvls2*); VZEx71 (*Pmyo-3::trxr-2::trxr-2* 3'-UTR) crecidos en OP50. El contenido total de A β fue determinado usando el anticuerpo monoclonal 6E10 (verde). En azul se muestran los núcleos de las células del nematodo teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). La detección de depósitos amiloides se realizó con el colorante fluorescente X-34 y su cuantificación se hizo empleando un total de 20 nematodos por condición. Los datos que se muestran en la esquina superior izquierda indican el número de depósitos amiloides \pm la desviación estándar. Se realizó la distribución t de student para dos muestras independientes sin encontrar diferencias significativas en (A) $P = 0.478$, mientras que en (B) las diferencias resultaron altamente significativas $P = 7.68E-13$. La barra blanca indica la escala a 50 μ m.

En conjunto, estos datos demuestran una implicación *in vivo* de TRXR-2 tanto en la parálisis dependiente de A β como en la formación de agregados β -amiloides en *C. elegans*, sugiriendo un posible papel protector de TRXR-2 frente a la enfermedad de Alzheimer.

CAPÍTULO IV.

DISCUSIÓN

Debido a que el estudio de las funciones del sistema tiorredoxina mitocondrial en organismos modelo como el ratón o *Drosophila* se ve impedido por los fenotipos de letalidad embrionaria o larvaria que presentan respectivamente (Conrad et al., 2004; Nonn et al., 2003; Missirlis et al., 2002; Matsui et al., 1996; Bondareva et al., 2007), nuestro grupo decidió caracterizar las funciones de dicho sistema en el nematodo *Caenorhabditis elegans*; modelo que aporta facilidades en la manipulación genética y que además, comparte una homología de casi el 50% con el sistema tiorredoxina mitocondrial de mamíferos.

Por la secuencia conservada de su sitio activo WCGPC y por la secuencia señal de entrada a mitocondria (MTS) que presenta en su extremo N-terminal, hemos identificado en este trabajo al gen *trx-2* como el gen que codifica a la tiorredoxina mitocondrial. Hemos demostrado que TRX-2 se comporta como una tiorredoxina, al ser capaz de reducir los enlaces disulfuro intramoleculares de la insulina, y también hemos comprobado *in vivo* que los genes *trx-2* y *trxr-2* de *C. elegans* codifican a proteínas de localización mitocondrial conducidas por sus respectivas MTS.

Utilizando fusiones transcripcionales y traduccionales a GFP de cada uno de los genes que conforman al sistema tiorredoxina mitocondrial en el nematodo, pudimos conocer el patrón de expresión de los genes *trx-2* y *trxr-2*. La expresión ubicua que presenta el gen *trxr-2* contrasta con la expresión restringida en las células musculares y en las neuronas AIYL/R y ASEL que muestra el gen *trx-2*, sugiriendo la posible existencia de sustratos adicionales para TRXR-2 en el nematodo además de TRX-2. Se ha reportado que la glutarredoxina mitocondrial Grx2 de mamíferos es un sustrato de la tiorredoxina reductasa mitocondrial (Johansson et al., 2004), por lo que lo mismo podría ocurrir en *C. elegans*. Además, no podemos descartar la presencia de otros sustratos para la TRXR-2 en mitocondria que no guarden relación funcional o estructural con las tiorredoxinas o con las glutarredoxinas.

Hemos observado que aunque TRX-2 únicamente se expresa en las células musculares y en las neuronas AIYL/R y ASEL en condiciones basales de crecimiento, también es capaz de expresarse en el intestino del nematodo cuando se induce la UPR^{mit}, indicando que la expresión de TRX-2 puede darse en tejidos adicionales dependiendo de las condiciones específicas de estrés a las cuales se someta. En este sentido, directamente podemos descartar al estrés oxidativo, generado con azida de sodio o paraquat o al estrés térmico, al no provocar cambios en los niveles de expresión de TRX-2 y/o de TRXR-2 en nematodos transgénicos expresando las fusiones con GFP transcripcionales y traduccionales respectivas.

C. elegans es el único metazoo descrito hasta el momento en donde el sistema tiorredoxina mitocondrial no es esencial para su supervivencia. Es sorprendente que mutantes homocigotos, simples y dobles *trx-2* y *txxr-2*, no muestren un fenotipo aparente, ya que crecen y se desarrollan de forma normal, su longevidad es similar a la que presenta la estirpe silvestre N2, su programa de apoptosis no difiere con respecto al N2, no manifiestan mayor sensibilidad a distintos agentes que inducen estrés oxidativo y tampoco exhiben un incremento en los niveles de producción de ERO. Estos resultados sugieren la presencia de un sistema redundante capaz de reemplazar la ausencia del sistema tiorredoxina mitocondrial, tanto en condiciones normales de crecimiento como en situaciones de estrés. Una posibilidad podría ser la producción de una isoforma de la tiorredoxina reductasa citosólica *txxr-1* dirigida a la mitocondria, tal y como ocurre en otros organismos (Reichheld *et al.*, 2005; Turanov *et al.*, 2006). Sin embargo, esta posibilidad se ha descartado al generar dobles mutantes *txxr-1; txxr-2*, los cuales también resultaron completamente viables y sin fenotipo aparente. Ante este resultado nos hemos preguntado, ¿qué sistema es el que mantiene a las distintas tiorredoxinas del nematodo en su estado activo reducido cuando la tiorredoxina reductasa citosólica y mitocondrial están ausentes?.

El sistema glutarredoxina se erige como el candidato indiscutible para sustituir las funciones del sistema tiorredoxina mitocondrial, basándonos en la abundante literatura sobre la redundancia funcional que existe entre ambos sistemas (ya sean citoplásmicos o mitocondriales) en diversos organismos (Reichheld *et al.*, 2007; Trotter y Grant, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Recientemente se ha descrito en *C. elegans*, que mutantes *trxr-1* alimentados con ARNi de la glutatión reductasa (*gsr-1*), muestran un fenotipo de arresto larvario de gran penetrancia debido a defectos en la muda de la cutícula (Stenvall *et al.*, 2010). Sin embargo, el silenciamiento por ARNi de *gsr-1* o de las cuatro glutarredoxinas del nematodo (*glrx-5*, *glrx-10*, *glrx-21* y *glrx-22*) en mutantes simples y dobles *trx-2* y *trxr-2*, no mostró ningún fenotipo sintético evidente. Debido a que la penetrancia del ARNi puede ser muy variable dependiendo de los fondos genéticos y de su expresión en tejidos, las combinaciones de mutaciones entre los sistemas glutarredoxina y tiorredoxina mitocondrial será necesario para demostrar de forma inequívoca si el sistema glutarredoxina del nematodo es capaz de reemplazar las funciones del sistema tiorredoxina mitocondrial.

El sistema tiorredoxina mitocondrial resulta por tanto, bajo condiciones normales de laboratorio, dispensable para los procesos de crecimiento, desarrollo y apoptosis que se llevan a cabo en *C. elegans*; sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que en la naturaleza este sistema pueda ser esencial para la viabilidad del nematodo.

Se ha observado que las tiorredoxinas pueden funcionar sinérgicamente con algunas chaperonas celulares; por ejemplo, con el objetivo de identificar nuevos sustratos para la chaperona 14-3-3, estudios de proteómica realizados por Meek y colaboradores (Meek *et al.*, 2004) identificaron a la Trx-1 humana interactuando con ésta durante la interfase y la mitosis en células HeLa. También, se ha descrito que la actividad de las chaperonas Hsp33 en *E. coli* (Hoffmann *et al.*, 2004), Ssb2 en levaduras (Vignols *et al.*, 2003) y Hdj2 en

humano (Choi *et al.*, 2006), es regulada por la reducción de sus enlaces disulfuro a través de los sistemas tiorredoxina o glutaredoxina. En este contexto, la inducción de los genes *trx-2* y *txxr-2* bajo la activación de la UPR^{mit} sugiere que el sistema tiorredoxina mitocondrial podría formar parte de la maquinaria de chaperonas requeridas para aliviar el estrés provocado por el incremento de proteínas mal plegadas.

El plegamiento oxidativo de proteínas, necesario para que éstas adquieran su conformación nativa, es catalizado por las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) y por Ero1 en el retículo endoplásmico (Bardwell *et al.*, 1993; Frand y Kaiser, 1999; Tu *et al.*, 2000). Las enzimas Mia40 y Erv1 realizan el mismo proceso en el espacio intermembrana de la mitocondria, para facilitar el importe a la matriz y conferir estabilidad estructural a las proteínas mitocondriales codificadas por el ADN nuclear (Allen *et al.*, 2005; Sideris y Tokatlidis, 2010). Se ha reportado que el glutatión, al igual que la TrxR-1 de mamíferos, son capaces de reducir a las PDI durante el proceso de isomerización (Gilbert, 1989; Hawkins *et al.*, 1991; Lundström y Holmgren, 1990). Por tanto, si el sistema tiorredoxina mitocondrial del nematodo es inducido cuando la UPR^{mit} se ve activada, es posible que *trx-2* o *txxr-2* transloquen al espacio intermembrana de la mitocondria bajo condiciones específicas de estrés proteotóxico (Hirasaka *et al.*, 2011), para participar en la reducción de Mia40 o en la reducción de los enlaces disulfuro de las proteínas mal plegadas, para promover su isomerización, su plegamiento adecuado y su posterior translocación hacia la matriz mitocondrial, actuando de esta manera en la vía de la UPR^{mit}.

En relación con nuestros resultados, Aldridge y colaboradores (Aldridge *et al.*, 2007) identificaron a Trx-2 dentro de un conjunto de genes que se ven activados por la UPR^{mit} en células de mamífero. En las regiones promotoras de cada uno de estos genes encontraron un grupo de secuencias conservadas, tales como sitios de unión al factor de transcripción CHOP (C/EBP *homology protein*) y elementos MURE (*mitochondrial UPR elements*), necesarios para

responder ante el estrés generado por proteínas mitocondriales mal plegadas. De acuerdo a nuestras observaciones, estas secuencias promotoras junto con los mecanismos de regulación transcripcional podrían encontrarse conservados en *C. elegans*.

El mantenimiento de la proteostasis celular y subcelular resulta esencial para la supervivencia de los seres vivos, ya que cualquier desequilibrio conduce a la formación, y eventual agregación, de proteínas mal plegadas. Debido a que la acumulación de proteínas mal plegadas caracteriza a numerosas enfermedades neurodegenerativas, dentro de las que se incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, es imprescindible que la maquinaria de plegamiento en cada compartimento celular funcione de forma adecuada (*Kirstein-Miles y Morimoto, 2010*).

En este trabajo, utilizando el modelo de la enfermedad de Alzheimer de *C. elegans* (*Link, 1995*), hemos encontrado que el gen *trxr-2* del nematodo ejerce un papel protector frente al fenotipo de parálisis progresiva que muestra este modelo, como consecuencia de la agregación del péptido β -amiloide en sus células musculares. Este papel protector no se comparte con el gen *trx-2*, por lo que la posibilidad de la existencia de sustratos adicionales para TRXR-2 adquiere aún mayor relevancia.

Hemos observado que mientras el silenciamiento de *trxr-2* claramente aumenta el fenotipo de parálisis en nematodos $A\beta$, la sobreexpresión de TRXR-2 no lo alivia. Además, el silenciamiento por ARNi de *trxr-2* no modifica substancialmente los niveles de especies oligoméricas de $A\beta$ ni la cantidad de depósitos amiloides, los cuales en cambio, están dramáticamente reducidos en nematodos que sobreexpresan TRXR-2. La falta de correlación entre la carga amiloide y los niveles de parálisis han sido previamente reportados en este modelo, ya que transgénicos que expresan el péptido $A\beta$ con mutaciones

puntuales en los aminoácidos Leu¹⁷Pro y Met³⁵Cys, poseen cargas amiloides totalmente reducidas y sin embargo continúan paralizando (*Fay et al., 1998; Link, 2006*), sugiriendo que la formación de fibras amiloides y su posterior deposición no es la primera causa de toxicidad en esta enfermedad.

La hipótesis amiloide propone que la formación de placas A β constituye un prerrequisito para causar toxicidad en la enfermedad de Alzheimer (*Hardy y Allsop, 1991*); sin embargo, el modelo de *C. elegans* deja en entredicho esta conjetura ya que también se ha observado que nematodos que expresan el péptido A β de manera inducible, tras algunas horas de inducción, paralizan sin mostrar ningún depósito A β detectable (*Drake et al., 2003*). Ratones transgénicos, modelos de la enfermedad de Alzheimer, muestran deficiencias morfológicas, de comportamiento y de memoria meses antes de que la deposición de placas A β sea aparente (*Jacobsen et al., 2006*). Estas observaciones, en conjunto con las nuestras, apuntan a que los depósitos A β no son requeridos para inducir el fenotipo de parálisis en *C. elegans*, sugiriendo por tanto que los depósitos intracelulares de A β no son las especies tóxicas o, que una pequeña agregación de A β , no visible como depósito, es la causante de la toxicidad. En este sentido la cantidad residual de A β , detectada en los ensayos inmunohistoquímicos y de western blot en nematodos A β que sobreexpresan TRXR-2, podría ser suficiente para inducir la parálisis.

Algunos mecanismos propuestos en *C. elegans* para explicar la toxicidad de A β señalan al estrés oxidativo que genera la expresión del péptido A β (*Drake et al., 2003*) y/o a la disrupción que generan las inclusiones de A β en las vías de degradación asociadas al retículo endoplásmico (ERAD) o en las vías de degradación autofágicas, como los causantes de su toxicidad (*Florez-McClure et al., 2007*).

Se ha observado que los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer manifiestan un exceso de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno como consecuencia de una disfunción mitocondrial (Jellinger, 2009; Lin y Beal, 2006; Sas et al., 2007; Baloyannis, 2006; Hirai et al., 2001; Reddy, 2007). Asimismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de A β , y su eventual localización a mitocondria, provocan un desequilibrio sobre el funcionamiento de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial, causando la fragmentación y disfunción del orgánulo (Manczak et al., 2006; X. Wang et al., 2008). En relación con estas observaciones, se ha visto que las mitocondrias de las células musculares en nematodos A β se muestran fragmentadas (Link, datos sin publicar). Resultados preliminares de nuestro grupo indican que el silenciamiento de *trxr-2* por ARNi produce un aumento de la fragmentación mitocondrial en nematodos A β , lo cual podría estar relacionado con el aumento de parálisis observado bajo estas mismas condiciones. Sin embargo, el hecho de que la carga total del A β disminuya de forma tan considerable cuando se sobreexpresa TRXR-2, sugiere que el gen *trxr-2* de *C. elegans* podría estar implicado en mecanismos de degradación de A β en este modelo.

El profundizar un poco más sobre los mecanismos moleculares por los que TRXR-2 degrada la mayor parte de la carga de A β en estos nematodos es de enorme interés. Una posibilidad interesante, consistiría en evaluar si la TRXR-2 del nematodo es capaz de interactuar con algunas de las proteínas implicadas en la degradación específica de A β y de depósitos amiloides en mamíferos, tales como la enzima convertidora de angiotensina, la enzima degradadora de insulina o la neprilisina (Bates et al., 2009), cada una de las cuales tiene un ortólogo en *C. elegans*. También sería importante averiguar si la TRXR-2 del nematodo modula el proceso de autofagia, ya que se ha visto que en transgénicos A β con fondo mutante *daf-2* (mutación que disminuye la señalización por la vía de la insulina) se produce una disminución de la

parálisis y un aumento de la degradación de A β por un mecanismo dependiente de autofagia (Florez-McClure *et al.*, 2007).

La caracterización del sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* realizado en esta tesis proporciona una nueva herramienta para continuar con la investigación sobre el funcionamiento de este sistema redox y su relación con la fisiología y patología de metazoos. Además, la facilidad de manipulación genética del nematodo abre camino para el uso de estos mutantes del sistema tiorredoxina mitocondrial en cribados genéticos para identificar otros sistemas involucrados en el mantenimiento de la homeostasis redox celular. De igual manera, con este estudio se abren nuevas posibilidades para entender el papel de los sistemas redox mitocondriales en las enfermedades neurodegenerativas y la implicación del sistema tiorredoxina mitocondrial en rutas de señalización que podrían ser claves para el descubrimiento de nuevos tratamientos para estas y otras patologías asociadas al correcto funcionamiento de la mitocondria.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES

1. La proteína TRX-2 de *Caenorhabditis elegans* codificada por el gen *B0024.9/trx-2* funciona enzimáticamente como una tiorredoxina al ser capaz de reducir los enlaces disulfuro intramoleculares de la insulina *in vitro*.
2. Los genes *trx-2* y *trxr-2* de *C. elegans* codifican a proteínas de localización mitocondrial, conducidas por sus correspondientes secuencias señal de entrada a mitocondria presentes en sus extremos N-terminales.
3. La expresión del gen *trxr-2* del nematodo es ubicua, mientras que la expresión del gen *trx-2* se da únicamente en las células musculares y en las neuronas AIYL/R y ASEL.
4. La región intergénica de 343 pb entre los genes *tpk-1* y *trxr-2* regula la transcripción del gen *trxr-2* en intestino y neuronas.
5. El alelo *tm2720* del gen *trx-2* es un alelo de pérdida de función, ya que genera una proteína truncada que carece de los últimos 50 aminoácidos, que no es funcional en ensayos de actividad enzimática.
6. Los alelos *tm2047* y *ok2267* del gen *trxr-2* son alelos nulos, ya que no expresan ninguna forma de ARNm.
7. El sistema tiorredoxina mitocondrial de *C. elegans* es dispensable en condiciones normales de laboratorio, no afecta a los eventos de apoptosis embrionarios ni de la línea germinal, no funciona como principal defensa antioxidante y no modifica la longevidad de los nematodos.
8. La expresión del sistema tiorredoxina mitocondrial se induce bajo condiciones que activan a la UPR mitocondrial.
9. La tiorredoxina reductasa mitocondrial de *C. elegans* ejerce un papel protector frente al fenotipo de parálisis progresiva que presentan los nematodos transgénicos que expresan el péptido A β humano.
10. La sobreexpresión de TRXR-2 no alivia el fenotipo de parálisis progresiva dependiente de A β pero sí reduce significativamente la carga total de A β así como la formación de depósitos amiloides.

CAPÍTULO VI.

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estirpes y medios de cultivo

6.1.1 Lista de estirpes de *C. elegans*

Todas las estirpes VZ usadas en este estudio están retrocruzadas 6 veces con la estirpe silvestre Bristol N2.

ESTIRPES	GENOTIPO	REFERENCIA
Estirpes básicas		
Bristol N2	Estirpe silvestre	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Center (CGC)
VZ13	<i>trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ12	<i>trxr-2 (tm2047) III</i>	Este estudio
VZ15	<i>trxr-2 (ok2267) III</i>	Este estudio
VZ17	<i>trxr-2 (tm2047) III; trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ22	<i>trxr-2 (ok2267) III; trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
Derivados de <i>rrf-3</i>		
NL2099	<i>rrf-3 (pk146) II</i>	<i>Sijen et al., 2001</i>
VZ29	<i>rrf-3 (pk1426) II; trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ30	<i>rrf-3 (pk1426) II; trxr-2 (tm2047) III</i>	Este estudio
VZ31	<i>rrf-3 (pk1426) II; trxr-2 (ok2267) III</i>	Este estudio
VZ33	<i>rrf-3 (pk1426) II; trxr-2 (tm2047) III; trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ38	<i>rrf-3 (pk1426) II; trxr-2 (ok2267) III; trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
Derivados de <i>daf-16::GFP</i>		
TJ356	<i>zls356 [Pdaf-16::daf-16::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] IV</i>	<i>Henderson y Johnson, 2001</i>
VZ25	<i>zls356 [Pdaf-16::daf-16::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] IV; trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ23	<i>trxr-2 (tm2047) III; zls356 [Pdaf-16::daf-16::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] IV</i>	Este estudio
VZ24	<i>trxr-2 (ok2267) III; zls356 [Pdaf-16::daf-16::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] IV</i>	Este estudio
Derivados de <i>skn-1::GFP</i>		
LD001	<i>Is007 [Pskn-1::skn-1::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] X</i>	<i>An y Blackwell, 2003</i>
VZ26	<i>trx-2 (tm2720) V; Is007 [Pskn-1::skn-</i>	Este estudio

VZ39	<i>1::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] X trxr-2 (tm2047) III; ls007 [Pskn-1::skn-1::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] X</i>	Este estudio
VZ40	<i>1::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] X trxr-2 (ok2267) III; ls007 [Pskn-1::skn-1::GFP; pRF4 (rol-6 (su1006))] X</i>	Este estudio
Otras estirpes de estrés		
TK22	<i>mev-1 (kn1) III</i>	<i>Ishii et al., 1990</i>
GA480	<i>sod-2 (gk257) I; sod-3 (tm760) X</i>	<i>Doonan et al., 2008</i>
SJ4005	<i>zcls4 [Phsp-4::GFP] V</i>	<i>Calfon et al., 2002</i>
SJ4100	<i>zcls13 [Phsp-6::GFP] V</i>	<i>Yoneda et al., 2004</i>
CL2070	<i>dvls70 [pCL25 (Phsp-16.2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	<i>Link et al., 1999</i>
CF1553	<i>mul84 [pAD76 (Psod-3::GFP)]</i>	<i>Libina et al., 2003</i>
CL2166	<i>dvls19 [pAF15 (Pgst-4::GFP::NLS); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	<i>Link y Johnson, 2002</i>
Dobles trxr-1;trxr-2		
VZ14	<i>trxr-2 (tm2047) III; trxr-1 (sv47) IV</i>	Este estudio
VZ21	<i>trxr-2 (ok2267) III; trxr-1 (sv47) IV</i>	Este estudio
Derivados de daf-2 y daf-16		
CB1370	<i>daf-2 (e1370) III</i>	<i>Kimura et al., 1997</i>
VZ87	<i>daf-2 (e1370) III; trxr-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ89	<i>daf-2 (e1370) III; trxr-2 (tm2047) III</i>	Este estudio
VZ90	<i>daf-2 (e1370) III; trxr-2 (ok2267) III</i>	Este estudio
CF1038	<i>daf-16 (mu86) I</i>	<i>Lin et al., 1997</i>
VZ102	<i>daf-16 (mu86) I; trxr-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ103	<i>daf-16 (mu86) I; trxr-2 (tm2047) III</i>	Este estudio
VZ101	<i>daf-16 (mu86) I; trxr-2 (ok2267) III</i>	Este estudio
GM6	<i>fer-15 (b26) II; daf-2 (e1370) III</i>	Proporcionado por Manuel Muñoz
VZ117	<i>fer-15 (b26) II; daf-2 (e1370) III; trxr-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ129	<i>fer-15 (b26) II; daf-2 (e1370) III; trxr-2 (tm2047) III</i>	Este estudio
VZ116	<i>fer-15 (b26) II; daf-2 (e1370) III; trxr-2 (ok2267) III</i>	Este estudio
Estirpes de fusión a GFP de trxr-2 y trxr-2		

VZ73	<i>vzEx17 [pVZ239 (Ptrx-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ74	<i>vzEx18 [pVZ239 (Ptrx-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ75	<i>vzEx19 [pVZ239 (Ptrx-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ57	<i>vzEx5 [pVZ207 (Ptrx-2::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ58	<i>vzEx6 [pVZ207 (Ptrx-2::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ59	<i>vzEx7 [pVZ207 (Ptrx-2::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ55	<i>vzEx8 [pVZ202 (Ptrx-2::trx-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ56	<i>vzEx9 [pVZ202 (Ptrx-2::trx-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ82	<i>vzEx20 [pVZ25 (Punc-32::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ83	<i>vzEx21 [pVZ25 (Punc-32::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ49	<i>vzEx4 [pVZ211 (Punc-32::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ42	<i>vzEx1 [pVZ212 (Punc-32::trxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ43	<i>vzEx2 [pVZ212 (Punc-32::trxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ44	<i>vzEx3 [pVZ212 (Punc-32::trxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ62	<i>vzEx12 [pVZ234 (Ptrxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ63	<i>vzEx13 [pVZ234 (Ptrxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ60	<i>vzEx10 [pVZ230 (Ptrxr-2::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ61	<i>vzEx11 [pVZ230 (Ptrxr-2::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ69	<i>vzEx14 [pVZ222 (Ptrxr-2::trxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ70	<i>vzEx15 [pVZ222 (Ptrxr-2::trxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio

VZ71	<i>vzEx16 [pVZ222 (Ptrxr-2::trxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
Morfología mitocondrial		
VZ104	<i>vzEx23 [pVZ228 (Pmyo-3::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ121	<i>trx-2 (tm2720) V; vzEx23 [pVZ228 (Pmyo-3::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ122	<i>trxr-2 (tm2047) III; vzEx23 [pVZ228 (Pmyo-3::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ125	<i>trxr-2 (ok2267) III; vzEx23 [pVZ228 (Pmyo-3::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ110	<i>trxr-2 (tm2047) III; trx-2 (tm2720) V; vzEx27 [pVZ228 (Pmyo-3::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ111	<i>trxr-2 (ok2267) III; trx-2 (tm2720) V; vzEx28 [pVZ228 (Pmyo-3::MTS::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
Colocalización mitocondrial		
PS6187	<i>unc-119 (ed3) III; syEx1155 [pAM34.1 (Pmyo-3::tomm-20::mRFP::3xMyc); unc-119(+)]</i>	Proporcionado por Dr. Amir Sapir
VZ141	<i>vzEx8 [pVZ202 (Ptrx-2::trx-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]; syEx1155 [pAM34.1 (Pmyo-3::tomm-20::mRFP::3xMyc); unc-119(+)]</i>	Este estudio
VZ142	<i>vzEx1 [pVZ212 (Punc-32::trxr-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]; syEx1155 [pAM34.1 (Pmyo-3::tomm-20::mRFP::3xMyc); unc-119(+)]</i>	Este estudio
Colocalización de TRX-2 en ASE y en AIY		
OH1098	<i>otIs133 [Pttx-3::RFP; unc-4(+)]</i>	Wenick y Hobert, 2004
VZ167	<i>otIs133 [Pttx-3::RFP; unc-4(+)]; vzEx18 [pVZ239 (Ptrx-2::GFP); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
OH4165	<i>otIs151 [[Pceh-36::RFP; pRF4 (rol-6 (su1006))]; otEx2416 [Pgcy-21::GFP; Punc-122::GFP]]</i>	Ortiz et al., 2006

VZ179	<i>otIs151</i> [[<i>Pceh-36::RFP</i> ; <i>pRF4 (rol-6 (su1006))</i>]; <i>otEx2416</i> [<i>Pgcy-21::GFP</i> ; <i>Punc-122::GFP</i>]; <i>vzEx18</i> [<i>pVZ239 (Ptrx-2::GFP)</i> ; <i>pRF4 (rol-6 (su1006))</i>]]	Este estudio
Derivados de α-sinucleína		
NL5901	<i>unc-119 (ed3) III</i> ; <i>pkIs2386</i> [<i>pRP2386 (Punc-54::α-sinucleína::YFP)</i> ; <i>unc-119(+)</i>] IV	van Ham et al., 2008
VZ137	<i>pkIs2386</i> [<i>pRP2386 (Punc-54::α-sinucleína::YFP)</i> ; <i>unc-119(+)</i>] IV; <i>trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ138	<i>trx-2 (tm2047) III</i> ; <i>pkIs2386</i> [<i>pRP2386 (Punc-54::α-sinucleína::YFP)</i> ; <i>unc-119(+)</i>] IV	Este estudio
VZ139	<i>trx-2 (ok2267) III</i> ; <i>pkIs2386</i> [<i>pRP2386 (Punc-54::α-sinucleína::YFP)</i> ; <i>unc-119(+)</i>] IV	Este estudio
VZ153	<i>trx-2 (tm2047) III</i> ; <i>pkIs2386</i> [<i>pRP2386 (Punc-54::α-sinucleína::YFP)</i> ; <i>unc-119(+)</i>] IV; <i>trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
VZ154	<i>trx-2 (ok2267) III</i> ; <i>pkIs2386</i> [<i>pRP2386 (Punc-54::α-sinucleína::YFP)</i> ; <i>unc-119(+)</i>] IV; <i>trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
Derivados del péptido β-amiloide		
CL2006	<i>dvIs2</i> [<i>pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42)</i> ; <i>pRF4 (rol-6 (su1006))</i>] II	Link, 1995
VZ18	<i>dvIs2</i> [<i>pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42)</i> ; <i>pRF4 (rol-6 (su1006))</i>] II; <i>trx-2 (tm2720) V</i>	Este estudio
CL2120	<i>dvIs14</i> [<i>pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42)</i> ; <i>pCL26 (Pmtl-2::GFP)</i>]	Fay et al., 1998
VZ274	<i>trx-2 (tm2047) III</i> ; <i>dvIs14</i> [<i>pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42)</i> ; <i>pCL26 (Pmtl-2::GFP)</i>]	Este estudio
CL2750	<i>dvIs100</i> [<i>pCL354 (Punc-54::Aβ 1-42)</i> ; <i>pCL26 (Pmtl-2::GFP)</i>]	Link et al., 1992
VZ223	<i>trx-2 (tm2047) III</i> ; <i>dvIs100</i> [<i>pCL354 (Punc-54::Aβ 1-42)</i> ; <i>pCL26 (Pmtl-2::GFP)</i>]	Este estudio
VZ209	<i>dvIs2</i> [<i>pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42)</i> ; <i>pRF4 (rol-6 (su1006))</i>] II; <i>vzEx71</i> [<i>pVZ394 (Pmyo-</i>	Este estudio

CL4176	3::trxr-2::trxr-2 3'UTR); (Punc-122::GFP] smg-1 (cc546ts) I; dvls27 [pAF (Pmyo-3:: Aβ 3-42::let-838 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))] X	Link et al., 2003
VZ297	smg-1 (cc546ts) I; dvls27 [pAF (Pmyo-3:: Aβ 3-42::let-838 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))] X; vzEx111 [pVZ394 (Pmyo-3::trxr-2::trxr-2 3'-UTR); Punc-122::GFP]	Este estudio

6.1.2 Lista de estirpes de *E. coli*

Estirpes de <i>E. coli</i>		
OP50	auxótrofo a uracilo	Brenner, 1974
HT115	F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10 (DE lysogen: lacUV5 promoter-T7 polymerase).	Sijen et al., 2001
DH5α	F- Φ80/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Studier y Moffatt, 1986
BL21	F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)	Studier, 2005

6.1.3 Medios de Cultivo

6.1.3.1 Medio de cultivo para *E. coli*

El medio Luria-Bertani (LB) se utilizó de manera rutinaria para realizar cultivos con *E. coli*. El medio LB contiene: 1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl. En caso de requerirlo, al medio se le añadió el antibiótico de selección. Así, para la búsqueda de transformantes en DH5α ó BL21 se utilizó una concentración final de 50 µg/mL de ampicilina. Para seleccionar transformates en HT115 se emplearon placas LB con ampicilina/tetraciclina a concentraciones finales de 50 µg/mL y 15 µg/mL respectivamente.

6.2 Mantenimiento de estirpes de *C. elegans*

6.2.1 Placas NGM

El mantenimiento general de las estirpes de *C. elegans* se realizó creciéndolas sobre un césped de *E. coli* OP50 en placas de agar NGM (3 g/L NaCl, 2.5 g/L

peptona, 17 g/L agar, 5 µg/mL colesterol, MgSO₄ 1 mM y tampón fosfato 0.05 M). Las placas de agar NGM se realizaron de acuerdo al protocolo estandarizado descrito por *Brenner, 1974*.

6.2.2 Tampón M9 y tampón S

El tampón M9, que contiene; 3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 mL MgSO₄ 1 M y H₂O hasta un litro, se utilizó principalmente para realizar lavados de los nemátodos y eliminar el exceso de bacteria, o para eliminar el exceso de hipoclorito después de un tratamiento de *bleaching*.

El tampón S contiene; 129 mL K₂HPO₄ 0.05 M, 871 mL KH₂PO₄ 0.05 M, 5.85 g NaCl, que junto con glicerol al 15% se utilizó para congelar stocks de *C. elegans*.

6.2.3 Limpieza de stocks contaminados, preparación de huevos y sincronización

La limpieza de stocks contaminados por algún otro tipo de bacterias, hongos o levaduras se realizó tratando hermafroditas adultas fértiles y placas saturadas de embriones con una solución de *bleaching*, la cual contiene 5% de hipoclorito de sodio y NaOH 5M. Esta solución elimina cualquier tipo de contaminación y degrada a todos los nematodos de cualquier estadio larvario, donde únicamente sobreviven los embriones protegidos por su envoltura.

Para realizar la descontaminación de stocks, en una esquina de la placa y fuera del césped de bacteria, se colocó una gota de 20 µL de la solución de *bleaching* fresca. Dentro de la gota se pusieron aproximadamente 10 hermafroditas adultas fértiles y su degradación se siguió a través de la lupa.

Las preparaciones de huevos a mayor escala se realizaron partiendo de placas saturadas de hermafroditas grávidas y embriones. Tanto las hermafroditas como los embriones se recogieron con tampón M9, se colocaron en tubos de

polipropileno de 15 mL y se centrifugaron a 1200 rpm durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se añadieron 14 mL de M9 para realizar un segundo lavado. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 3 mL de una solución de *bleaching* fresca, el tubo se mantuvo en agitación y se observó bajo la lupa continuamente. Una vez que la mayoría de los nematodos comenzaban a romperse se añadieron 10 mL de M9. Se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante por aspiración. Los embriones se lavaron 3 veces con 14 mL de M9 para eliminar los restos de lejía e hidróxido de sodio.

Después de una preparación de huevos, en caso de haber requerido una sincronización de animales L1, los embriones se dejaron en 3 o 4 mL de M9 en un tubo de polipropileno de 15 mL durante 24 horas a 20 °C en agitación. Los embriones eclosionan y se mantienen en estadio L1 debido a la ausencia de comida, una vez que su medio es suplementado con OP50 o que las larvas se transfieren a placas NGM con comida continúan con su desarrollo normal.

6.2.4 Congelación de estirpes de *C. elegans*

Para la congelación de estirpes del nematodo se utilizaron de tres placas NGM, saturadas de gusanos sin comida. Se procuró que las placas tuvieran suficientes animales en estadio larvario L1 para optimizar el rendimiento de la congelación. Los nematodos se recuperaron de las placas con tampón S en un tubo de polipropileno de 15 mL, una vez recogidos de las tres placas, se resuspendieron en 3 mL de tampón S y se añadieron 3 mL de glicerol al 30%. El volumen final de 6 mL se dividió en 6 criotubos de 1 mL cada uno, los criotubos con la mezcla de congelación se colocaron en un bloque de poliestireno expandido perforado para permitir una congelación progresiva de los mismos, éstos se guardaron a -80 °C. Al día siguiente se realizó una prueba de congelación, descongelando un único vial para comprobar la eficiencia del proceso, los demás tubos se guardaron en sus respectivas cajas normales de stock y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

6.3 Lista de primers y plásmidos

6.3.1 Lista de primers

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	FINALIDAD
PRIMERS BÁSICOS DE RASTREO DE ALELOS		
AMV-168	GTCATTGTTGATTTCCACGCAG	Rastrear alelo <i>tm2720</i> del gen <i>trx-2</i>
AMV-169	CTGTCATTTCGTATATCGATTGG	Rastrear alelo <i>tm2720</i> del gen <i>trx-2</i>
AMV-192	TGATCATGCTGGTGAAGTGGC	Rastrear alelo <i>tm2720</i> del gen <i>trx-2</i>
AMV-162	CAATTTTCTGATGCTTCTATC	Rastrear alelo <i>tm2047</i> y reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-163	CTGTTGAGATGACTACATTCGG	Rastrear alelos <i>tm2047</i> y <i>ok2267</i> del gen <i>trxr-2</i>
AMV-132	GGTCCCTCTTAATTCACAAC	Rastrear alelos <i>tm2047</i> y <i>ok2267</i> del gen <i>trxr-2</i>
AMV-133	CCTAGTTTTACCGGTACTA	Rastrear alelo <i>ok2267</i> del gen <i>trxr-2</i>
AMV-134	CTGCGGCATTTGGTCCAACA	Rastrear alelo <i>ok2267</i> y reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-236	TATAAATATTTCTGCGATTGCGATTGG	Rastrear alelo <i>pk1426</i> del gen <i>rrf-3</i>
AMV-237	CTCAAATCTCGCATACGAGAGG	Rastrear alelo <i>pk1426</i> del gen <i>rrf-3</i>
AMV-238	ATCAACGTCTTCTGGACAAATC	Rastrear alelo <i>pk1426</i> del

		gen <i>rff-3</i>
AMV-326	AAGTGTCGAGTGAAGGGAGC	Rastrear alelo <i>mu86</i> del gen <i>daf-16</i>
AMV-327	GACAGAATGAGGGAGATGAGC	Rastrear alelo <i>mu86</i> del gen <i>daf-16</i>
AMV-328	ACTCGCCTTCATCATCTATCC	Rastrear alelo <i>mu86</i> del gen <i>daf-16</i>

PRIMERS PARA CONSTRUCCIONES DE ARNi

AMV-80	TTTTTCTAGAATGCAGAAAGCAC	Para construcción de ARNi del gen <i>trx-2</i>
AMV-81	AATACTGCAGTTAAGCAGCGAGAAC	Para construcción de ARNi del gen <i>trx-2</i>
AMV-35	CAATTCTAGAATGCTTCTATCCAC	Para construcción de ARNi del gen <i>trxr-2</i>
AMV-36	ACTTCTCGAGTTATCCACAGCATC	Para construcción de ARNi del gen <i>trxr-2</i>

PRIMERS PARA CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN EN pET-15b

AMV-150	CATGCATATGGACATTGATTCTGTTGAAG	Expresión de TRX-2 en pET-15b
AMV-151	CATGGGATCCTTATTAAGCAGCGAGAACGT	Expresión de TRX-2 en pET-15b
AMV-406	CGACGGATCCCTACTAATTTAAATGAACCATTA AACT	Expresión de Δ TRX-2 en pET-15b

PRIMERS PARA CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE GFP

AMV-176	CAGTCTGCAGGCTTGGTCGTGGAGATTGAAG	Expresión transcripcional y traduccional del gen <i>trx-2</i>
---------	---------------------------------	---

AMV-276	CGCGTGGCCAAAAGTGCTTTCTGCATCTGATAA AAACAT	Expresión transcripcional del gen <i>trx-2</i>
AMV-177	TAGTGGCCAAGAAAACAGAAGCGCCGTGAG	Expresión transcripcional con MTS del gen <i>trx-2</i>
AMV-79	ACACTGGCCAAAGCAGCGAGAACGTCCTCGA	Expresión traduccional del gen <i>trx-2</i>
AMV-31	AAGCCTGCAGCTTACAATATATTCCAAAGC	Expresión transcripcional del gen <i>trxr-2</i>
AMV-32	GATCGGATCCCACGTAATCACCCATTCTAG	Expresión transcripcional del gen <i>trxr-2</i>
AMV-216	GTTAGTCGACCTGCCTTTGCGAGCATTGTTAG	Expresión transcripcional y traduccional del gen <i>trxr-2</i>
AMV-217	GATACCCGGGGATCCTGCTCCAATTACAAT	Expresión transcripcional con MTS del gen <i>trxr-2</i>
AMV-218	GTATCCCGGGCCACAGCATCCCTGAGTTC	Expresión transcripcional del gen <i>trxr-2</i>
AMV-228	GACTGTGCGACGGGTCTACAACTTGATTCTC	Expresión transcripcional y traduccional del gen <i>trxr-2</i>
AMV-277	GCGACCCGGGGTGGATAGAAGCATCAGAAAAT TGAT	Expresión transcripcional del gen <i>trxr-2</i>

PRIMERS PARA PCR RECOMBINANTE

AMV-210	GCTGCCTTTGCGAGCATTGTTAG	PCR recombinante del gen <i>trxr-2</i>
AMV-212	GGATAGAAGCATTCTAGTTGATTCTG	PCR recombinante del gen <i>trxr-2</i>
AMV-211	ACAGAATCAACTAGAATGCTTCTATCCAC	PCR recombinante

		del gen <i>trxr-2</i>
AMV-213	TTATCCACAGCATCCCTGAGTTC	PCR recombinante y reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>

PRIMERS PARA CONSTRUCCIONES DE SOBREPRESIÓN DE TRXR-2

AMV-388	ATGCGGATCCAGAAAAAATGCTTCTATCCACTT TC	Sobrexpresión de TRXR-2 en músculo
AMV-131	GATCGAATTCTTATTATCCACAGCATCCC	Sobrexpresión de TRXR-2 en músculo

PRIMERS PARA REACCIONES DE RT-PCR

AMV-247	ATGACACAATTACGTCATTTTTTC	Reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-248	CTGTTTTTCGACATTGATTCTGTT	Reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-249	ACTTCCTTGTCTTCCGTTTAC	Reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-250	TCAATTACTTCAATGCCTATGCCG	Reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-251	CAAGATTGTGATAACTGGTACAGAC	Reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-252	GTAATTGGAGCAGGATCTGGAG	Reacciones de RT-PCR del gen <i>trxr-2</i>
AMV-162	CAATTTTCTGATGCTTCTATC	Reacciones de RT-PCR y rastreo de alelo <i>tm2047</i> del gen <i>trxr-2</i>
AMV-134	CTGCGGCATTTGGTCCAACA	Reacciones de RT-PCR y rastreo de alelo <i>ok2267</i> del gen <i>trxr-2</i>
AMV-213	TTATCCACAGCATCCCTGAGTTC	Reacciones

	de RT-PCR y PCR recombinante del gen <i>trxr-2</i>
--	---

6.3.2 Lista de plásmidos

NÚMERO	PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICA	REFERENCIA
PLÁSMIDOS PARA ENSAYOS DE ARNI			
pVZ3	pL4440	Vector vacío usado en los ensayos de ARNi en <i>C. elegans</i> .	<i>Timmons y Fire, 1998</i>
pVZ5	pL4440/ <i>unc-22</i>	Plásmido empleado como control de interferencia en ensayos de ARNi.	<i>Timmons y Fire, 1998</i>
pVZ10	pL4440/ <i>trxr-2</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trxr-2</i> .	Este estudio
pVZ16	pL4440/ <i>trx-2</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trx-2</i> .	Este estudio
PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE GFP			
pVZ239	pPD95.77/ <i>Ptrx-2::GFP</i>	Plásmido para estudiar la expresión del gen <i>trx-2</i> .	Este estudio
pVZ207	pPD95.77/ <i>Ptrx-2::MTS::GFP</i>	Plásmido para estudiar la funcionalidad de la secuencia señal de entrada en mitocondria del gen <i>trx-2</i> .	Este estudio
pVZ202	pPD95.77/ <i>Ptrx-2::trx-2::GFP</i>	Plásmido para estudiar la expresión y localización subcelular del gen <i>trx-2</i> .	Este estudio
pVZ25	pPD95.77/ <i>Punc-32::GFP</i>	Plásmido para estudiar la expresión de <i>unc-32</i> , primer gen del operón en el que se incluye el gen <i>trxr-2</i> .	Este estudio
pVZ211	pPD95.77/ <i>Punc-32::MTS::GFP</i>	Plásmido para estudiar la funcionalidad de la secuencia señal de entrada en mitocondria del gen <i>trxr-2</i> bajo el control del promotor de <i>unc-32</i> .	Este estudio
pVZ212	pPD95.77/ <i>Punc-</i>	Plásmido para estudiar la	Este estudio

pVZ234	32::trxr-2::GFP	expresión y localización subcelular del gen <i>trxr-2</i> bajo el control del promotor de <i>unc-32</i> .	Este estudio
pVZ230	pPD95.77/Ptrxr-2::GFP	Plásmido para estudiar la expresión del gen <i>trxr-2</i> bajo el control de su propio promotor.	
pVZ222	pPD95.77/Ptrxr-2::MTS::GFP	Plásmido para estudiar la funcionalidad de la secuencia señal de entrada en mitocondria del gen <i>trxr-2</i> bajo el control de su propio promotor.	
pVZ222	pPD95.77/Ptrxr-2::trxr-2::GFP	Plásmido para estudiar la expresión y localización subcelular del gen <i>trxr-2</i> bajo el control de su propio promotor.	Este estudio

MARCADORES DE TRANSGÉNESIS

pVZ225	pPD95.77/Punc-122	Plásmido usado como marcador de transgénesis por expresión de GFP en coelomocitos de <i>C. elegans</i> .	<i>Miyabayashi et al, 1999</i>
pVZ309	pRF4 (pUC16)/rol-6(su1006)	Plásmido usado como marcador de transgénesis por expresión de fenotipo <i>roller</i> en <i>C. elegans</i> .	<i>Mello et al, 1991</i>

PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

pVZ146	pET-15b::His-CeTRX-2	Plásmido para expresar y purificar la proteína madura TRX-2 en <i>E. coli</i> BL21	Este estudio
pVZ386	pET-15b::His-CeΔTRX-2	Plásmido para expresar y purificar la proteína truncada madura TRXR-2 en <i>E. coli</i> BL21.	Este estudio

PLÁSMIDOS DE SOBREEXPRESIÓN

pVZ394	pPD133.54/Pmyo-3::trxr-2::trxr-2 3'-UTR	Plásmido para sobreexpresar TRXR-2 en las células musculares de <i>C. elegans</i> .	Este estudio
--------	---	---	--------------

6.4 Generación de transgénicos

Todas las fusiones transcripcionales y traduccionales con GFP se generaron usando el vector de clonación pPD95.77, excepto para la construcción pVZ394 en la que se empleó el vector pPD133.54 que incluye el promotor de *myo-3* para expresión en células musculares y, en el cual se sustituyó la CFP por el ORF y el extremo 3'-UTR del gen *trxr-2* (Ver apartado 6.3.2). Todas las construcciones se inyectaron a una concentración de 50 ng/μL, excepto el plásmido pVZ25 que se inyectó a 10 ng/μL. Algunas construcciones se co-inyectaron en las gónadas de hermafroditas silvestres junto con el plásmido pRF4 (50 ng/μL), el cual contiene el marcador dominante *rol-6* (*su1006*) que induce el fenotipo *roller* en *C. elegans*. Otras construcciones se co-inyectaron con el plásmido pVZ225 (50 ng/μL), el cual expresa GFP específicamente en los coelomocitos del nematodo.

Al menos dos o tres líneas independientes de transgénicos se obtuvieron de cada construcción (excepto para el plásmido pVZ211, del cual solo se obtuvo una línea) y se confirmó que en todos los casos mostraran patrones de expresión similares o idénticos. Todas las líneas obtenidas se mantuvieron en stock pero solo una de cada construcción se usó para estudios de expresión.

6.5 Microscopía

Para el análisis microscópico de *C. elegans*, los animales se montaron en una gota de 5 μL de levamisol 10 mM sobre una fina capa de agarosa en agua al 3% y se cubrieron con un cubreobjetos de 24x24 mm. Las imágenes de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) y de fluorescencia fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia Zeiss AxioImager M2 ApoTome. Las imágenes se capturaron con el software AxioVision 4.8 (Zeiss) y fueron ajustadas de brillo y contraste usando el software Adobe Photoshop 10 (Adobe Systems).

6.6 Purificación de ARN total de *C. elegans*

Para la preparación de ARN total se recolectaron hermafroditas grávidas con tampón M9 y se trataron con una solución de *bleaching* fresca. Se realizó todo el procedimiento descrito anteriormente para obtener una preparación de huevos (ver sección 5.2.3) y los embriones obtenidos se lavaron varias veces con tampón M9. El ARN total de la preparación de embriones se extrajo usando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se trató con Amplification Grade DNase I (Sigma).

6.7 Reacciones de RT-PCR

1 µg de ARN total purificado de *C. elegans* y tratado con DNasa, se usó para la síntesis de cDNA empleando el iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) en un volumen final de 20 µL de mezcla de reacción. El cDNA sintetizado fue directamente amplificado por PCR utilizando la MBL-Taq DNA Polimerase (Dominion-MBL).

La amplificación del cDNA de los genes *trx-2* y *trxr-2* silvestres y mutantes se realizó mediante PCR anidada. Así, para amplificar el cDNA del gen *trx-2* de la estirpe silvestre y del mutante *trx-2* (*tm2720*), se utilizaron los siguientes pares de primers: AMV247-AMV249 y AMV248-AMV249. Del mismo modo, el cDNA del gen *trxr-2* de la estirpe silvestre y del mutante *trxr-2* (*tm2047*) se amplificaron con los primers AMV250-AMV213 y AMV251-AMV213; mientras que para el mutante *trxr-2* (*ok2267*) la amplificación se realizó con los primers AMV162-AMV213 y AMV252-AMV134 (ver sección 5.3.1).

6.8 Expresión y purificación de proteína recombinante

Para la expresión y purificación de las proteínas TRX-2 y ΔTRX-2 recombinantes, el cDNA del gen *trx-2* tanto de la estirpe silvestre como del mutante *tm2720* se amplificó con los primers AMV150-AMV151 para el silvestre y, AMV150-AMV406 para el mutante siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El producto de amplificación se clonó primeramente en el vector

pGEM®-T Easy (Promega) y posteriormente fue subclonado en los sitios de restricción *Bam*HI y *Nde*I del vector pET-15b (Novagen) para generar las construcciones pET-15b::His-CeTRX-2 y pET-15b::His-CeΔTRX-2. Estas construcciones se transformaron en la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* y su expresión fue inducida durante 4 horas con IPTG 1mM a 37 °C después de haber alcanzado una O.D.₆₀₀ entre 0.5 y 0.7 en medio LB líquido con ampicilina (50 µg/mL).

Una vez realizada la inducción, las células se recolectaron por centrifugación a 13000 rpm. Se retiró el sobrenadante y, el precipitado de células se resuspendió en una solución de 5mL de Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, 60 µg de DNasa I, 3 mg de lisozima y β-mercaptoetanol 5 mM. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y después se sonicó con un sonicador Sonoplus HD2070 y vástago Microtip Bandelin MS73 a 50% de potencia y modo pulsante 5, durante 30 minutos en hielo.

Justo antes de sonicar la muestra con la proteína His-CeΔTRX-2, la mezcla anterior se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con 800 µL de sarkosyl al 10% en tampón Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM y, se agitó vigorosamente para solubilizar la proteína.

Al finalizar la sonicación, ambas muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El extracto libre de células de cada una de las muestras se filtró a través de membranas Millipore de 0,25 µm y se purificó a través de una columna de afinidad BD TALON® Metal Affinity (Clontech) equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM. La proteína His-CeTRX-2 fue eluída con imidazol 25 mM, mientras que la proteína His-CeΔTRX-2 se eluyó con imidazol 50 mM.

Finalmente, las proteínas purificadas se dializaron individualmente en tampón fosfato 20 mM pH 7.4 para eliminar el imidazol del medio.

6.9 Ensayos de actividad tiorredoxina

La actividad enzimática de las proteínas recombinantes His-CeTRX-2 e His-Ce Δ TRX-2 fue ensayada por su habilidad de reducir insulina bovina (Sigma) usando DTT o, NADPH y tiorredoxina reductasa de hígado de rata como donadores de electrones.

Para el ensayo con DTT, se preparó una mezcla de reacción formada por 40 μ L de Tris-HCl 1mM pH 7.5, 10 μ L de EDTA 0.2 M y 200 μ L de insulina bovina a 10 mg/mL. 25 μ L de esta solución, se mezclaron con el volumen correspondiente a una concentración 5 μ M de His-CeTRX-2 y de His-Ce Δ TRX-2 individualmente y, el volumen final de la reacción se ajustó con agua miliQ hasta 200 μ L. Finalmente, se añadieron 2 μ L de DTT 100 mM para iniciar la reacción y la actividad tiorredoxina se ensayó midiendo el aumento de la absorbancia a 595 nm cada minuto a lo largo de una hora. Los enlaces disulfuro que unen a las cadenas A y B de la insulina son reducidos por la tiorredoxina y como consecuencia, la cadena B libre de la insulina precipita y genera una turbidez visible a 595 nm (*Holmgren et al., 1995*).

Para el ensayo con NADPH y tiorredoxina reductasa, 20 μ L de una mezcla de reacción formada por 40 μ L de HEPES 1M pH 7.4, 8 μ L de NADPH a 40 mg/mL y 100 μ L de insulina a 10 mg/mL, se mezclaron con cada una de las proteínas purificadas utilizando una concentración final de 5 μ M de cada una de éstas. El volumen final de reacción se llevó a 200 μ L con agua miliQ y la reacción fue iniciada al agregar 1 μ L de TrxR-1 de hígado de rata a una concentración de 1.5 mg/mL. La actividad tiorredoxina se midió por el descenso de absorbancia a 340 nm debido al consumo de NADPH o bien, por el aumento de ésta a 595 nm debido a la precipitación de la cadena B libre de insulina. En

el primer caso la reacción se siguió cada minuto durante 15 minutos y en el segundo caso cada minuto durante una hora.

En ambos ensayos se empleó como control positivo la proteína recombinante de humano TRX-1 con cola de histidina (His-hTRX-1).

6.10 Ensayos fenotípicos de *C. elegans*

6.10.1 Ensayos de estrés

Para los ensayos realizados con paraquat, arsenito de sodio, azida de sodio y choque térmico se utilizaron hermafroditas en estadio larvario L4 bien alimentadas y sincronizadas. Para el ensayo con juglona se emplearon hermafroditas jóvenes adultas. En todos los casos, los gusanos que no mostraron bombeo de la faringe o movimiento después de estimularlos por tocamiento con hilo de platino, se consideraron muertos, se contabilizaron y se eliminaron de las placas.

El porcentaje de supervivencia para cada tratamiento se calculó como la media de al menos tres ensayos independientes.

6.10.1.1 Tratamiento con arsenito de sodio

Para ensayar la sensibilidad a arsenito de sodio (NaAsO_2 , Sigma), 30 hermafroditas L4 se transfirieron a placas NGM con comida que contenían arsenito de sodio a una concentración final de 10 mM. Los nematodos se observaron cada dos horas para su cuantificación (Oláhová *et al.*, 2008).

6.10.1.2 Tratamiento con juglona

El ensayo de resistencia a juglona ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_3$) se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por de Castro *et al.*, 2004; en este experimento, 30 hermafroditas grávidas, bien alimentadas y en su primer día de adulto, se colocaron en placas frescas de juglona 240 μM (Sigma) a temperatura

ambiente. Su viabilidad se determinó cada 2 horas durante un periodo total de 8 horas.

6.10.1.3 Tratamiento con paraquat

En este experimento, 100 hermafroditas L4 se colocaron en placas NGM con comida y paraquat ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$, Sigma) a una concentración final de 4 mM. La supervivencia se siguió diariamente a lo largo de 4 días.

6.10.1.4 Tratamiento con azida de sodio

El tratamiento con azida de sodio (NaN_3) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por *Artal-Sanz y Tavernarakis, 2009* con ligeras modificaciones. En este ensayo, 30 hermafroditas L4 se colocaron en placas con comida suplementadas con azida de sodio (Sigma) 1 mM durante 18 horas a 20 °C. Pasadas las 18 horas de incubación, los animales se transfirieron a placas NGM sin azida de sodio con comida y se cuantificó su supervivencia después de un periodo de recuperación de 3 horas.

6.10.1.5 Tratamiento de choque térmico

Este ensayo se realizó colocando 30 hermafroditas L4 bien alimentadas en placas NGM con comida, previamente calentadas a 37 °C. La supervivencia de los animales fue determinada cada dos horas hasta que todos éstos murieron.

6.10.2 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

La formación de ERO se cuantificó empleando 2,7-diclorodihidrofluoresceín-diacetato (H_2 -DCF-DA) el cual es un compuesto permeable a membranas y no fluorescente mientras se encuentra en estado reducido; sin embargo, cuando se oxida a nivel celular y se eliminan los grupos acetato por la acción de esterasas celulares se vuelve fluorescente e impermeable (*Schulz et al., 2007*). La cuantificación de ERO se realizó con hermafroditas sincronizadas en estadio L4 incubadas durante 5 horas a 20 °C en placas NGM con 1 mM de azida de sodio ó con 0.8 mM de paraquat. Animales en estadio L4 creciendo en

placas normales NGM sin azida de sodio o paraquat, se emplearon como control.

Tras el tratamiento, los animales se lavaron varias veces con tampón M9 para reducir el contenido de bacteria y, un volumen de 50 μ L de la suspensión de gusanos se colocó por cuadruplicado en los pocillos de una microplaca de 96, opaca de fondo y de paredes. Seguidamente, se añadieron a las suspensiones de gusanos 50 μ L de una solución fresca 100 μ M de H2-DCF-DA para obtener una concentración final de 50 μ M del compuesto. En cada placa se prepararon en paralelo pocillos control que contenían nematodos provenientes de cada tratamiento sin H2-DCF-DA y H2-DCF-DA sin animales.

Inmediatamente después de añadir el H2-DCF-DA, se midió la fluorescencia basal en un lector de microplacas a longitudes de onda de excitación/emisión de 485 y 520 nm. Las placas se mantuvieron durante 1 hora en agitación a 20 °C y al finalizar se realizó una segunda medición. La fluorescencia inicial y las señales de fluorescencia de los pocillos control se eliminaron de la segunda medición. Los valores se normalizaron a contenido de proteína total determinados por el método del ácido bicinónico (Pierce).

6.10.3 Ensayos de fertilidad

Para determinar la fertilidad de las estirpes, 10 hermafroditas L4 se colocaron en placas individuales de NGM, estos animales se transfirieron cada día a placas nuevas de NGM durante el periodo de puesta de huevos. Los embriones no fecundados y los embriones eclosionados fueron cuantificados.

6.10.4 Análisis de apoptosis en embriones y en la línea germinal

Los cuerpos apoptóticos fueron detectados por su forma refractil usando un microscopio Leica DM6000 equipado con óptica DIC y fueron cuantificados como lo describen Reddien y Horvitz (*Reddien y Horvitz, 2000*). Para la cinética de apoptosis embrionaria, 3 embriones de cada genotipo fueron montados para

su análisis microscópico 4D durante el estadio de 2-4 células. El análisis microscópico 4D se llevó a cabo realizando grabaciones de 30 planos focales de los embriones durante 10 horas a 25 °C. Como resultado se obtuvieron películas 4D (imagen del embrión 3D en el tiempo) para cada genotipo. El *software* SIMI Biocell (SIMI GmbH, Germany) permitió rastrear cada célula del embrión, en el espacio a lo largo del tiempo, como se describe en *Nieto et al., 2010*. El tiempo desde que nace la célula apoptótica hasta que muere fue cuantificado para definir la cinética de muerte celular. Para la apoptosis de la línea germinal fueron analizados 20 brazos de gónada por genotipo. La detección de los cuerpos apoptóticos y su cuantificación se realizaron tal y como se describe para la apoptosis embrionaria.

6.10.5 Ensayos de longevidad

A partir de una preparación de huevos se realizó una sincronización de nematodos L1, los cuales se dejaron crecer hasta L4 en placas NGM con comida. A placas frescas de NGM se transfirieron 4 grupos de 25 hermafroditas L4 por placa, para tener un total de 100 individuos por estirpe. El día en el que los animales alcanzaron el estadio larvario L4 fue considerado como el día cero.

Las hermafroditas se transfirieron a placas frescas diariamente hasta que cesó la producción de progenie, después los nematodos se transfirieron a placas nuevas cada segundo o tercer día pero fueron observados diariamente para su cuantificación. Aquellos animales que no respondieron al estímulo mecánico de tocamiento con hilo de platino o que no mostraron movimiento en la faringe se consideraron muertos. Los animales que se salieron de la placa y se secaron o que murieron por eclosión interna de los embriones, fueron censurados y considerados como tales en el conjunto de datos. Estos ensayos se realizaron a 20 ó 25 °C según se indique y fueron repetidos al menos dos veces. Tanto para la elaboración de las gráficas de longevidad como para el análisis estadístico se utilizó el *software* GraphPad Prism.

6.11 Ensayos de ARN de interferencia (ARNi)

Para los ensayos de ARNi se emplearon placas NGM, conteniendo concentraciones finales de 25 µg/mL de carbenicilina y 1 mM de IPTG, a las cuales se les sembró *E. coli* HT115 transformada ya sea con el plásmido vacío pL4440 o con las respectivas construcciones a ensayar previamente crecidas en medio LB con 50 µg/mL de ampicilina durante 15 horas a 37 °C. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda una noche para inducir el ARN de doble cadena. Los fenotipos fueron evaluados a 20 °C desde la primera hasta la cuarta generación. Para cada nueva generación se permitió a las hermafroditas grávidas interferidas poner huevos durante dos horas en placas frescas de ARNi.

6.12 Producción de anticuerpos anti-TRXR-2 e inmunodetección

Los péptidos sintéticos Ac-RTDKRSGKILADEFDRASC-amida y Ac-CVKLHITKRSGQDPRT-amida derivados de la secuencia proteica de TRXR-2 de *C. elegans* se conjugaron con KLH y se utilizaron para inmunizar conejos (New England Peptides, USA). Después de cuatro inmunizaciones se recolectó el suero y el anticuerpo policlonal fue purificado por cromatografía de afinidad usando una mezcla de los dos péptidos.

En el western blot para detectar TRXR-2, se utilizaron extractos provenientes de 100 nematodos sincronizados de cada estirpe, crecidos en OP50 durante una generación y recolectados manualmente en el primer día de adulto en 15 µL del tampón de lisis de proteínas (NaCl 150 mM, NP-40 1% y TrisHCl 50 mM pH 8). Después de tres ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido, se añadió Laemmli buffer 5X y se calentó la mezcla durante 10 minutos a 95 °C. Las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% y después se transfirieron a una membrana Immobilon-P PVDF (Millipore) durante 1 hora a 75 mA bajo condiciones semi-secas. La membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche desnatada en polvo, se probó con el anticuerpo policlonal anti-TRXR-2 usando una dilución 1:1000 y con el

anticuerpo de conejo anti-IgG (Sigma) a una dilución 1:10 000, como anticuerpo secundario. El kit ECL (GE) se empleó para la detección de señal siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (Sigma) se empleó como control de carga utilizando una dilución 1:5000.

6.13 Ensayos de parálisis, inmunohistoquímica y cuantificación de depósitos β -amiloides

Nematodos transgénicos A β se sincronizaron por puesta de huevos durante dos horas a 16 °C. Posteriormente los hermafroditas se eliminaron de la placa y la progenie se dejó crecer a 20 °C para las estirpes constitutivas CL2006, CL2120 y CL2750. Para la estirpe inducible CL4176, la progenie se creció durante 48 horas a 16 °C y después 24 horas a 23 o 25 °C para inducir la expresión de A β . La cuantificación de la parálisis en las estirpes constitutivas se inició en el primer día de adulto y se finalizó al día 14 contando diariamente animales paralizados. La cuantificación de la parálisis en las estirpes inducibles se realizó 24 horas después del cambio de temperatura, para inducir A β , durante cada hora. Se consideraron nematodos paralizados a aquellos que después de recibir un estímulo mecánico con hilo de platino no podían completar su movimiento, sinusoidal o *roller* normal, y que únicamente movían la cabeza; o, a aquellos que estaban asociados con un halo generado por el césped de bacteria ingerido, indicativo de su incapacidad de movimiento y de su acceso limitado de comida.

Para los ensayos inmunohistoquímicos, los nematodos fueron fijados y permeabilizados de acuerdo a lo previamente descrito por *Link et al., 1992* a excepción de que el glutaraldehído fue eliminado en el paso de fijación. Los nematodos permeabilizados fueron teñidos con el anticuerpo monoclonal 6E10 (Covance) utilizando una concentración final de 5 mg/mL. Como anticuerpo secundario se empleó Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón (Invitrogen) a una concentración de 20 mg/mL. Los animales teñidos fueron observados en un

microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot equipado con capacidad digital de deconvolución (Intelligent Imaging Innovations).

Para la detección de depósitos β -amiloides, los nematodos fueron teñidos con el colorante fluorescente específico de amiloides X-34 tal y como se describe en *Link et al., 2001*. Brevemente, nematodos en el primer día de adultos crecidos a 20 °C fueron incubados durante 2 horas en gotas de 20 μ L de X-34 1 mM disuelto en Tris 1 mM a pH 7.5. A los animales teñidos se les eliminó el exceso de colorante enjuagándolos una vez en gotas de PBS, después se transfirieron a placas NGM con OP50 y se dejaron recuperarse durante toda la noche a 20 °C. Los nematodos teñidos fueron inmovilizados con azida de sodio y posteriormente fueron observados en el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot.

6.14 Western blot y detección de A β total

Para la detección del péptido β -amiloide mediante western blot, se emplearon nematodos transgénicos A β crecidos en su correspondiente ARNi durante dos generaciones, o en OP50. Después de la segunda generación interferida, se realizó el ensayo de western blot a partir de nematodos sincronizados mediante puesta de huevos durante dos horas a 16 °C y después dejando crecer los embriones a 20 °C; o dejando crecer los embriones 48 horas a 16 °C para después inducir la expresión de A β a 23 o 25 °C, según se tratase de las estirpes constitutivas o inducibles.

El western blot se realizó tomando 100 nematodos sincronizados de cada estirpe a estudiar, en el primer día de adulto (que es cuando inicia la parálisis) o 24 horas después de la inducción de A β , en 15 μ L de tampón de lisis de proteínas (NaCl 150 mM, NP-40 1% y TrisHCl 50 mM pH 8). Después de tres ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido, se añadió Laemmli buffer 5X y se calentó la mezcla durante 10 minutos a 95 °C. Inmediatamente después, se cargaron cada una de las muestras en geles de

gradiente de poliacrilamida 4-20% (Bio-Rad). El gel se corrió a 120 V y después se transfirió a una membrana Immobilon-P PVDF (Millipore) durante 1 hora a 75 mA bajo condiciones semi-secas. La membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche desnatada en polvo, se probó con el anticuerpo monoclonal 6E10 (Covance) a una dilución 1:1000 y con una dilución 1:10 000 de anticuerpo secundario anti-ratón (Sigma). El kit ECL (GE) se empleó para la detección de señal siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (Sigma) se empleó como control de carga utilizando una dilución 1:5000.

CAPÍTULO VII.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboobaker, A. A., & Blaxter, M. L. (2000). Medical significance of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of Medicine*, 32(1), 23-30.
- Adachi, H., Fujiwara, Y., & Ishii, N. (1998). Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in *Caenorhabditis elegans* mutants with long (age-1) and short (mev-1) life spans. *The journals of gerontology Series A Biological sciences and medical sciences*, 53(4), B240-B244.
- Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & development*, 17(20), 2481-95.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & And Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell. Amino Acids* (Vol. 54, p. 1725).
- Albertson, D. G., & Thomson, J. N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 275(938), 299-325.
- Aldridge, J. E., Horibe, T., & Hoogenraad, N. J. (2007). Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PloS one*, 2(9), e874.
- Alegado, R. A., Campbell, M. C., Chen, W. C., Slutz, S. S., & Tan, M.-W. (2003). Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Cellular Microbiology*, 5(7), 435-444.
- Allen, M. A., Hillier, L. W., Waterston, Robert H, & Blumenthal, T. (2011). A global analysis of *C. elegans* trans-splicing. *Genome Research*, 255-264.
- Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D. P., Lisowsky, T., & Tokatlidis, K. (2005). Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *Journal of Molecular Biology*, 353(5), 937-944.
- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2009a). Alimentary system, pharynx. *WormAtlas*.
- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2009b). Alimentary system, intestine. *WormAtlas*.
- Ambrosio, G., Zweier, J. L., Duilio, C., Kuppusamy, P, Santoro, G., Elia, P. P., et al. (1993). Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18532-18541.
- An, J. H., & Blackwell, T. K. (2003). SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & development*, 17(15), 1882-93.
- Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Robin, M.-A., & Avadhani, N. G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *The Journal of Cell Biology*, 161(1), 41-54.
- Andersen, K. M., Madsen, L., Prag, S., Johnsen, A. H., Semple, C. A., Hendil, K. B., et al. (2009). Thioredoxin Txn11/TRP32 Is a Redox-active Cofactor of the 26 S Proteasome*S. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 15246-15254.

- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Ankarcrona, M., & Hultenby, K. (2002). Presenilin-1 is located in rat mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(3), 766-770.
- Anson, R. M., & Hansford, R. G. (2004). Mitochondrial influence on aging rate in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 3(1), 29-34.
- Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., & Kenyon, Cynthia. (2002). Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 295(5554), 502-505.
- Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10(1), 2-18.
- Arnér, E. S., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(20), 6102-9.
- Arnér, E. S., Nordberg, J., & Holmgren, A. (1996). Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(1), 268-274.
- Artal-sanz, M., Tsang, W. Y., Willems, E. M., Grivell, L. A., Lemire, B. D., Spek, V. D., et al. (2003). The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 278, 32091-32099.
- Artal-Sanz, M., & Tavernarakis, N. (2009a). Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature*, 461(7265), 793-797.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 420-430.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.
- Baloyannis, S. J. (2004). Mitochondrial alterations Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimers Disease and Other Dementias*, 19(2), 89-93.
- Baloyannis, Stavros J. (2006). Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers disease JAD*, 9(2), 119-126.
- Banerjee, Rebecca, Starkov, A. A., Beal, M Flint, & Thomas, B. (2009). Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(7), 651-663.
- Banerjee, Ruma. (2008). *Redox Biochemistry*. (D. Becker, M. Dickman, V. Gladyshev, & S. Ragsdale, Eds.) *Redox Biochemistry* (p. 338). Wiley.
- Bar-Noy, S., Gorlatov, S. N., & Stadtman, T. C. (2001). Overexpression of wild type and SeCys/Cys mutant of human thioredoxin reductase in *E. coli*: the role of selenocysteine in the catalytic activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(1), 51-61.
- Barbieri, M., Bonafè, M., Franceschi, C., & Paolisso, G. (2003). Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity

- from yeast to humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285(5), E1064-71.
- Bardwell, J. C., Lee, J. O., Jander, G., Martin, N., Belin, D., & Beckwith, J. (1993). A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(3), 1038-1042.
- Barnhart, B. C., Alappat, E. C., & Peter, Marcus E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Seminars in Immunology*, 15(3), 185-193.
- Barr, M M, DeModena, J., Braun, D., Nguyen, C. Q., Hall, D H, & Sternberg, P. W. (2001). The *Caenorhabditis elegans* autosomal dominant polycystic kidney disease gene homologs *lov-1* and *pkd-2* act in the same pathway. *Current Biology*, 11(17), 1341-1346.
- Barr, Maureen M, & Sternberg, P. W. (1999). A Polycystic Kidney-disease Gene Homologue Required for Male Mating Behavior in *C. elegans*. *Nature*, 401(6751), 386-389.
- Bartke, A. (2008). Insulin and aging. *Cell cycle Georgetown Tex*, 7(21), 3338-3343.
- Bates, K. A., Verde, G., Li, Q.-X., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. L., et al. (2009). Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Molecular Psychiatry*, 14(5), 469-486.
- Berg, D., Lehne, M., Müller, N., Siegmund, D., Münkler, S., Sebald, W., et al. (2007). Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death and Differentiation*, 14(12), 2021-2034.
- Berndt, C., Lillig, Christopher Horst, & Holmgren, Arne. (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Medical Biochemistry*, 1783, 641 - 650.
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(10), 768-778.
- Biggs, W. H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K., & Arden, K. C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7421-7426.
- Bjedov, I., Toivonen, J. M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., et al. (2010). Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism*, 11(1), 35-46.
- Björnstedt, M, Kumar, S., & Holmgren, A. (1992). Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(12), 8030-8034.
- Björnstedt, M, Kumar, S., & Holmgren, A. (1995). Selenite and selenodiglutathione: reactions with thioredoxin systems. *Methods in Enzymology*, 252, 209-219.

- Blesa, J. R., Solano, A., Briones, P., Prieto-Ruiz, J. A., Hernández-Yago, J., & Coria, F. (2007). Molecular genetics of a patient with Mohr-Tranebjaerg Syndrome due to a new mutation in the DDP1 gene. *NeuroMolecular Medicine*, 9(4), 285-291.
- Blumenthal, T., Evans, D., Link, Christopher D, Guffanti, A., Lawson, D., Thierry-mieg, J., et al. (2002). A global analysis of *Caenorhabditis elegans* operons. *Nature*, 851-854.
- Bohnert, M., Pfanner, N., & Laan, M. V. D. (2007). A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Letters*, 581, 2802-2810.
- Bondareva, A. a, Capecchi, M. R., Iverson, S. V., Li, Y., Lopez, N. I., Lucas, O., et al. (2007). Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(6), 911-923.
- Borutaite, V. (2010). Mitochondria as decision-makers in cell death. *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(5), 406–416.
- Boveris, A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Advances in experimental medicine and biology*, 78 (Tissue Hypoxia Ischemia), 67-82.
- Breger, J., Fuchs, B. B., Aperis, G., Moy, T. I., Ausubel, F. M., & Mylonakis, E. (2007). Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay. (B. P. Cormack, Ed.) *PLoS Pathogens*, 3(2), 11.
- Brenner, S. (1973). The genetics of behaviour. *British medical bulletin*, 29(3), 269-271.
- Brenner, Sydney. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 71-94.
- Brignull, H. R., Moore, F. E., Tang, S. J., & Morimoto, Richard I. (2006). Polyglutamine proteins at the pathogenic threshold display neuron-specific aggregation in a pan-neuronal *Caenorhabditis elegans* model. *Journal of Neuroscience*, 26(29), 7597-7606.
- Brito, O. M. de, & Scorrano, L. (2010). An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum–mitochondria relationship. *The EMBO journal*, (June), 2715-2723.
- Brot, N., & Weissbach, H. (1983). Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 223(1), 271-281.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., et al. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 546-554.
- Butler, J. a, Ventura, Natascia, Johnson, Thomas E, & Rea, Shane L. (2010). Long-lived mitochondrial (Mit) mutants of *Caenorhabditis elegans* utilize a novel metabolism. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4977-4988.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., & Baron, C. (1991). Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(12), 463-467.

- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, Heather P., et al. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92-6.
- Cao, L., Shitara, H., Horii, T., Nagao, Y., Imai, H., Abe, K., et al. (2007). The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nature Genetics*, 39(3), 386-90.
- Carelli, V., La Morgia, C., Valentino, M. L., Barboni, P., Ross-Cisneros, F. N., & Sadun, A. A. (2009). Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(5), 518-528.
- Cargill, S. L., Carey, J. R., Müller, H.-G., & Anderson, G. (2003). Age of ovary determines remaining life expectancy in old ovariectomized mice. *Aging Cell*, 2(3), 185-190.
- Castro, E. de, Hegi de Castro, S., & Johnson, Thomas E. (2004). Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. *Free radical biology & medicine*, 37(2), 139-45.
- Chae, H Z, Kim, H. J., Kang, S. W., & Rhee, S G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 45(2-3), 101-112.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Chalfie, M., & White, J. (1988). The nervous system. In W. B. Wood (Ed.), *The nematode Caenorhabditis elegans* (1988th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- Choi, H.-I., Lee, S. P., Kim, K. S., Hwang, C. Y., Lee, Y.-R., Chae, S.-K., et al. (2006). Redox-regulated cochaperone activity of the human DnaJ homolog Hdj2. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(4), 651-659.
- Choi, P., Golts, N., Snyder, H., Chong, M., Petrucelli, L., Hardy, J, et al. (2001). Co-association of parkin and alpha-synuclein. *NeuroReport*, 12(13), 2839-2843.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*.
- Cohen, E., Du, D., Joyce, D., Kapernick, E. A., Volovik, Y., Kelly, J. W., et al. (2010). Temporal requirements of insulin / IGF-1 signaling for proteotoxicity protection. *Aging Cell*, (November 2009), 126-134.
- Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M., et al. (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325(5937), 201-204. American Association for the Advancement of Science.
- Comelli, M., Genero, N., & Mavelli, I. (2009). Caspase-independent apoptosis in Friend's erythroleukemia cells: role of mitochondrial ATP synthesis

- impairment in relocation of apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), 49-59.
- Conley, K. E., Jubrias, S. A., & Esselman, P. C. (2000). Oxidative capacity and ageing in human muscle. *The Journal of Physiology*, 526 Pt 1(Pt 1), 203-210.
- Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., et al. (2004). Essential Role for Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Hematopoiesis , Heart Development , and Heart Function. *Society*, 24(21), 9414-9423.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195-1214.
- Copeland, J. M., Cho, J., Lo, T., Hur, J. H., Bahadorani, S., Arabyan, T., et al. (2009). Extension of Drosophila life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Current Biology*, 19(19), 1591-8.
- Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M. T., Shoffner, J. M., Beal, M F, & Wallace, D C. (1992). Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nature Genetics*, 2(4), 324-329.
- Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W., & Arnheim, N. (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7370-7374.
- Cotter, V. T. (2007). The burden of dementia. *The American Journal Of Managed Care*, 13 Suppl 8(8), S193-S197.
- Cox, G. N., Kusch, M., DeNevi, K., & Edgar, R. S. (1981). The cuticle of *C. elegans*. II. Stage-specific changes in ultrastructure and protein composition during postembryonic development. *Developmental Biology*, 86, 277-285.
- Culetto, E., & Sattelle, D. B. (2000). A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Human molecular genetics*, 9(6), 869-77.
- Cunnea, P. M., Miranda-Vizuete, Antonio, Bertoli, G., Simmen, T., Damdimopoulos, Anastasios E, Hermann, S., et al. (2003). ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1059-1066.
- Dada, L. A., Chandel, N. S., Ridge, K. M., Pedemonte, C., Bertorello, A. M., & Sznajder, J. I. (2003). Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *Journal of Clinical Investigation*, 111(7), 1057-1064.
- Dagda, R. K., Cherra, S. J., Kulich, S. M., Tandon, A, Park, D., & Chu, C. T. (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on

- oxidative stress and mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13843-13855.
- Damdimopoulos, Anastasios E, Miranda-Vizuete, Antonio, Pelto-Huikko, Markku, Gustafsson, J.-A., & Spyrou, Giannis. (2002). Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), 33249-57.
- Damdimopoulos, Anastasios E, Miranda-Vizuete, Antonio, Treuter, E., Gustafsson, J.-A., & Spyrou, Giannis. (2004). An alternative splicing variant of the selenoprotein thioredoxin reductase is a modulator of estrogen signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38721-38729.
- Das, K. C., & Das, C. K. (2000). Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2), 443-447.
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4-5), 279-289.
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703(2), 93-109.
- Delatycki, M. B., Williamson, R., & Forrest, S. M. (2000). Friedreich ataxia: an overview. *Journal of Medical Genetics*, 37(1), 1-8.
- Delmas, P. (2004). Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell*, 118(2), 145-148.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089-9100.
- DiMauro, Salvatore, & Davidzon, G. (2005). Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine*, 37(3), 222-232.
- DiMauro, Salvatore, & Hirano, Michio. (2005). Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscular disorders NMD*, 15(4), 276-286.
- DiMauro, Salvatore, & Schon, E. A. (2003). Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *The new england journal of medicine*, 348, 2656-2668.
- Dong, M., Bridges, J. P., Apsley, K., Xu, Y., & Weaver, T. E. (2008). ERdj4 and ERdj5 Are Required for Endoplasmic Reticulum-associated Protein Degradation of Misfolded Surfactant Protein C. (J. Brodsky, Ed.) *Molecular Biology of the Cell*, 19(6), 2620-2630.
- Doonan, R., McElwee, J. J., Matthijssens, F., Walker, G. A., Houthoofd, K., Back, P., et al. (2008). Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, 22(23), 3236-3241.

- Dorman, J. B., Albinder, B., Shroyer, T., & Kenyon, C. (1995). The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 141(4), 1399-1406.
- Drake, J., Link, Christopher D., & Butterfield, D. A. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1–42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging*, 24(3), 415-420.
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, Doris, Sosunov, A. A., McKhann, G. M., et al. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 14(10), 1097-1105.
- Dudeja, V., Mujumdar, N., Phillips, P., & Chugh, R. (2009). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. *Gastroenterology*, 136(5), 1772-1782.
- Eklund, H., Gleason, F. K., & Holmgren, a. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins*, 11(1), 13-28.
- Ellgaard, L., & Ruddock, L. W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Reports*, 6(1), 28-32.
- Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817-829.
- Emmons, S. W., & Lipton, J. (2003). Genetic basis of male sexual behavior. *Journal of Neurobiology*, 54(1), 93-110.
- Engström, N. E., Holmgren, a, Larsson, a, & Söderhäll, S. (1974). Isolation and characterization of calf liver thioredoxin. *The Journal of biological chemistry*, 249(1), 205-10.
- Enns, G. M. (2003). The contribution of mitochondria to common disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, 80(1-2), 11-26.
- Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C J, & Link, C D. (1998). In vivo aggregation of beta-amyloid peptide variants. *Journal of Neurochemistry*, 71(4), 1616-1625.
- Fay, D. S., Fluet, a, Johnson, C J, & Link, C D. (1998). In vivo aggregation of beta-amyloid peptide variants. *Journal of neurochemistry*, 71(4), 1616-25.
- Fierro-González, J. C., Cornils, A., Alcedo, J., Miranda-Vizuet, Antonio, & Swoboda, P. (2011). The Thioredoxin TRX-1 Modulates the Function of the Insulin-Like Neuropeptide DAF-28 during Dauer Formation in *Caenorhabditis elegans*. (E. Nollen, Ed.) *PLoS ONE*, 6(1), e16561.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(November), 239-247.
- Florez-McClure, M. L., Hohsfield, L. A., Fonte, G., Bealor, M. T., & Link, Christopher D. (2007). Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of beta-amyloid peptide in *C. elegans*. *Autophagy*, 3(6), 569-580.
- Frand, A. R., & Kaiser, C. A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 4(4), 469-477.

- Freisinger, P., Fütterer, N., Lankes, E., Gempel, K., Berger, T. M., Spalinger, J., et al. (2006). Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome caused by deoxyguanosine kinase (DGUOK) mutations. *Archives of Neurology*, 63(8), 1129-1134.
- Frey, T. G., Renken, C. W., & Perkins, G. A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Mitochondrion*, 1555, 196 - 203.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(III), 97-112.
- Fridovich, Irwin. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515-7.
- Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., & Miki, H. (2006). The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nature Cell Biology*, 8(5), 501-508.
- Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Yao, Z., Plun-Favreau, Helene, Deas, E., Klupsch, K., et al. (2009). PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death. *Molecular Cell*, 33(5-3), 627-638.
- Gardner, H. W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 7(1), 65-86.
- Gasdaska, P. Y., Gasdaska, J. R., Cochran, S., & Powis, G. (1995). Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Letters*, 373(1), 5-9.
- Gasser, Thomas. (2009). Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11(July), e22.
- Gebert, N., Ryan, M. T., Pfanner, N., Wiedemann, N., & Stojanovski, D. (2011). Mitochondrial protein import machineries and lipids : A functional connection. *BBA - Biomembranes*, 1808(3), 1002-1011.
- Geisberger, R., Kiermayer, C., Hömig, C., Conrad, M., Schmidt, J., Zimmer-Strobl, U., et al. (2007). B- and T-cell-specific inactivation of thioredoxin reductase 2 does not impair lymphocyte development and maintenance. *Biological chemistry*, 388(10), 1083-90.
- George, J. L., Mok, S., Moses, D., Wilkins, S., Bush, A. I., Cherny, R. A., et al. (2009). Targeting the Progression of Parkinson's Disease. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 9-36.
- Gilbert, H. F. (1989). Catalysis of thiol/disulfide exchange: single-turnover reduction of protein disulfide-isomerase by glutathione and catalysis of peptide disulfide reduction. *Biochemistry*, 28(18), 7298-7305.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6715-6719.
- Gilkerson, R. (2009). Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41, 1899-1906.

- Gladyshev, V N, Jeang, K. T., & Stadtman, T. C. (1996). Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 6146-6151.
- Gladyshev, V N, Krause, M., Xu, X. M., Korotkov, K. V., Kryukov, G. V., Sun, Q. a, et al. (1999). Selenocysteine-containing thioredoxin reductase in *C. elegans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 259(2), 244-9.
- Goto, Y., Nonaka, I., & Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 348(6302), 651-653.
- Gottlieb, S., & Ruvkun, G. (1994). daf-2, daf-16 and daf-23: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 137(1), 107-120.
- Gravato-Nobre, M. J., & Hodgkin, Jonathan. (2005). *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cellular Microbiology*, 7(6), 741-751.
- Gray, C. W., Ward, R. V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., et al. (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 267(18), 5699-5710.
- Greer, E. L., & Brunet, A. (2009). Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*, 8(2), 113-127.
- Gromer, S, Schirmer, R. H., & Becker, K. (1999). News and views on thioredoxin reductases. *Redox report communications in free radical research*, 4(5), 221-228.
- Gromer, Stephan, & Gross, J. H. (2002). Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase. Implications for the antitumor effects of selenium. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 9701-9706.
- Gromer, Stephan, Urig, S., & Becker, Katja. (2004). The thioredoxin system--from science to clinic. *Medicinal Research Reviews*, 24(1), 40-89.
- Gulbins, E., Jekle, a, Ferlinz, K., Grassmé, H., & Lang, F. (2000). Physiology of apoptosis. *American journal of physiology. Renal physiology*, 279(4), F605-15.
- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H. R., & Hengartner, M O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development Cambridge England*, 126(5), 1011-1022.
- Hall, A., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *The FEBS journal*, 276(9), 2469-2477. Wiley Online Library.
- Ham, T. J. van, Thijssen, Karen L, Breitling, R., Hofstra, R. M. W., Plasterk, R. H. a, & Nollen, E. a a. (2008). *C. elegans* model identifies genetic

- modifiers of alpha-synuclein inclusion formation during aging. *PLoS genetics*, 4(3).
- Han, X.-J., Tomizawa, K., Fujimura, A., Ohmori, I., Nishiki, T.-I., Matsushita, M., et al. (2011). Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta medica Okayama*, 65(1), 1-10.
- Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2008). The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*, 454(7203), 463-9.
- Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S.-J., & Kenyon, Cynthia. (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 6(1), 95-110.
- Hardy, J, & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(10), 383-388.
- Hardy, J, & Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185.
- Hardy, John, Cai, H., Cookson, M. R., Gwinn-Hardy, K., & Singleton, A. (2007). Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Annals of Neurology*, 7(6), 657-666.
- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20(4), 145-147.
- Harman, Denham. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300.
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), 392-395.
- Hawkins, H. C., Blackburn, E. C., & Freedman, R. B. (1991). Comparison of the activities of protein disulphide-isomerase and thioredoxin in catalysing disulphide isomerization in a protein substrate. *The Biochemical journal*, 275, 349-53.
- Hayashi, S., Hajiro-Nakanishi, K., Makino, Y., Eguchi, H., Yodoi, J, & Tanaka, H. (1997). Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic Acids Research*, 25(20), 4035-4040.
- Hayashi, T., Ueno, Y., & Okamoto, T. (1993). Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 11380-11388.
- Haynes, C. M., & Ron, David. (2010). The mitochondrial UPR – protecting organelle protein homeostasis. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 22), 3849-3855.
- Henchcliffe, C., & Beal, M Flint. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(11), 600-609.
- Henderson, S. T., & Johnson, T E. (2001). daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current biology : CB*, 11(24), 1975-80.

- Hendrick, J. P., Hodges, P. E., & Rosenberg, L. E. (1989). Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(11), 4056-60.
- Herndon, L. A., Schmeissner, P. J., Dudaronek, J. M., Brown, P. A., Listner, K. M., Sakano, Y., et al. (2002). Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*, 419(6909), 808-14.
- Hillier, L. W., Reinke, V., Green, P., Hirst, M., Marra, M. A., & Waterston, Robert H. (2009). Massively parallel sequencing of the polyadenylated transcriptome of *C. elegans*. *Genome Research*, (206), 657-666.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., et al. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *English Journal*, 21(9), 3017-3023.
- Hirano, M., & DiMauro, S. (2001). ANT1, Twinkle, POLG, and TP: new genes open our eyes to ophthalmoplegia. *Neurology*, 57(12), 2163-2165.
- Hirasaka, K., Lago, C. U., Kenaston, M. A., Fathe, K., Nowinski, S. M., Nikawa, T., et al. (2011). Identification of a redox-modulatory interaction between uncoupling protein 3 and thioredoxin 2 in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxidants redox signaling*, 15(10), 2645-61.
- Hirota, K., Matsui, M., Murata, M., Takashima, Y., Cheng, F. S., Itoh, T., et al. (2000). Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(1), 177-182.
- Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., et al. (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27891-27897.
- Hirota, Kiichi, Matsui, Minoru, Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, Kenjiro, & Yodoi, Junji. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3633-3638.
- Hodgkin, J. (1988). Sexual dimorphism and sex determination. In W. B. Wood (Ed.), *The nematode Caenorhabditis elegans* (pp. 243-279). Cold Spring Harbor, New York.
- Hoffmann, J. H., Linke, K., Graf, P. C., Lilie, H., & Jakob, U. (2004). Identification of a redox-regulated chaperone network. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 23(1), 160-168.
- Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The Amino Acid Sequence of the Protein from *Escherichia coli* B. *European J Biochem*, 6, 475-484.
- Holmgren, A. (1977). Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(13), 4600-4606.
- Holmgren, a. (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure (London, England : 1993)*, 3(3), 239-43.

- Holmgren, A. & Björnstedt, Mikael. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, 252.
- Holmgren, A. & Lyckeborg, C. (1980). Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(9), 5149-5152.
- Holmgren, Arne. (2000). Antioxidant Function of Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *Antioxidants & redox signaling*, 2(4), 811–820.
- Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K., & Morgan-Hughes, J. A. (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *The American Journal of Human Genetics*, 46(3), 428-433.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P. C., et al. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421(6919), 182-187.
- Honda, Y., & Honda, S. (1999). The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB journal*: 13(11), 1385-93.
- Hope, I. A. (1999). *C. elegans: A practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Hsin, H., & Kenyon, C. (1999). Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature*, 399(6734), 362-366.
- Huang, P., Pleasance, E. D., Maydan, J. S., Hunt-Newbury, R., O'Neil, N. J., Mah, A., et al. (2007). Identification and analysis of internal promoters in *Caenorhabditis elegans* operons. *Genome research*, 17(10), 1478-85.
- Huang, X., Masselli, A., Frisch, S. M., Hunton, I. C., Jiang, Y., & Wang, J. Y. J. (2007). Blockade of tumor necrosis factor-induced Bid cleavage by caspase-resistant Rb. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29401-29413.
- Imarisio, S., Carmichael, J., Korolchuk, V., Chen, C.-W., Saiki, S., Rose, C., et al. (2008). Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *The Biochemical journal*, 412(2), 191-209.
- Ishii, N., Takahashi, K., Tomita, S., Keino, T., Honda, S., Yoshino, K., et al. (1990). A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutation Research*, 237(3-4), 165-171.
- Jacobsen, J. S., Wu, C.-cheng, Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*. 103(13) 5161-5166.
- Jakob-Roetne, R., & Jacobsen, H. (2009). Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(17), 3030-3059.
- Jakupoglu, C., Przemeck, G. K. H., Schneider, M., Moreno, G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., et al. (2005). Cytoplasmic Thioredoxin Reductase Is Essential for Embryogenesis but Dispensable for Cardiac Development. *Society*, 25(5), 1980-1988.

- Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., & Prives, C. (1997). Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes & Development*, 11(5), 558-570.
- Jellinger, K. A. (2009). Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission*, 116(9), 1111-1162.
- Jia, K., Chen, D., & Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development*, 131(16), 3897-3906.
- Jiménez, A., Peltto-Huikko, Markku, Gustafsson, J.-A., & Miranda-Vizuete, Antonio. (2006). Characterization of human thioredoxin-like-1: potential involvement in the cellular response against glucose deprivation. *FEBS Letters*, 580(3), 960-967.
- Jiménez, A., Zu, W., Rawe, V. Y., Peltto-Huikko, Markku, Flickinger, C. J., Sutovsky, P., et al. (2004). Spermatocyte/spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34971-34982.
- Johansson, C., Lillig, C. H., & Holmgren, A. (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7537-7543.
- Jones, Dean P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American journal of physiology. Cell physiology*, 295(4), C849-68.
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., et al. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310(5751), 1193-1196.
- Kahn, N. W., Rea, Shane L, Moyle, S., Kell, A., & Johnson, Thomas E. (2008). Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical journal*, 409(1), 205-13.
- Kaletsky, R., & Murphy, C. T. (2010). The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. *Disease models & mechanisms*, 3(7-8), 415-9.
- Kaletta, T., & Hengartner, Michael O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(5), 387-98.
- Kaletta, T., Van Der Craen, M., Van Geel, A., Dewulf, N., Bogaert, T., Branden, M., et al. (2003). Towards understanding the polycystins. *Nephron Experimental Nephrology*, 93(1), e9-e17.
- Kalinina, E. V., Chernov, N. N., & Saprin, A. N. (2008). Involvement of Thio-, Peroxi-, and Glutaredoxins in Cellular Redox-Dependent Processes. *Biochemistry Moscow*, 73(13), 1493-1510.
- Kamath, R., Fraser, A., Dong, Y., & Poulin, G. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421, 231-237.

- Kampkötter, A., Gombitang Nkwonkam, C., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., et al. (2007). Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Archives of toxicology*, 81(12), 849-58.
- Kapahi, Pankaj, Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., & Benzer, S. (2004). Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current*, 14(10), 885-890.
- Karimpour, S., Lou, J., Lin, L. L., Rene, L. M., Lagunas, L., Ma, X., et al. (2002). Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene*, 21(41), 6317-6327.
- Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kytälä, A., Zeviani, M., Comi, G. P., et al. (2000). Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*, 289(5480), 782-785.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461-464.
- Kenyon, Cynthia. (2010). A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1204, 156-162.
- Kenyon, Cynthia. (2011). The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1561), 9-16.
- Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(March), 504-512.
- Kern, R., Malki, A., Holmgren, Arne, & Richarme, G. (2003). Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *The Biochemical journal*, 371(Pt 3), 965-72.
- Khaidakov, M., Heflich, R. H., Manjanatha, M. G., Myers, M. B., & Aidoo, A. (2003). Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutation Research*, 526(1-2), 1-7.
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. B. (1997). *daf-2*, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277(5328), 942-946.
- Kirkwood, T. B., & Austad, S. N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408(6809).
- Kirstein-Miles, J., & Morimoto, R.I. (2010). *Caenorhabditis elegans* as a model system to study intercompartmental proteostasis: Interrelation of mitochondrial function, longevity, and neurodegenerative diseases. *Developmental Dynamics*, 239(5), 1529–1538.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., et al. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 329 (6676), 605-608.
- Klass, M., Wolf, N., & Hirsh, D. (1976). Development of the male reproductive system and sexual transformation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 52(1), 1-18.

- Kozlov, G., Ma, P., Thomas, D. Y., & Gehring, K. (2010). A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS Journal*, 44, 3924-3936.
- Krogh-Madsen, R., Thyfault, J. P., Broholm, C., Mortensen, O. H., Olsen, R. H., Mounier, R., et al. (2010). A 2-wk reduction of ambulatory activity attenuates peripheral insulin sensitivity. *Journal of applied physiology*, 108(5), 1034-40.
- Kumar, S., Björnstedt, M., & Holmgren, A. (1992). Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 207(2), 435-439.
- Kurooka, H., Kato, K., Minoguchi, S., Takahashi, Y., Ikeda, J., Habu, S., et al. (1997). Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics*, 39(3), 331-339.
- Kurz, C. L., & Ewbank, J. J. (2003). *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nature Reviews Genetics*, 4(5), 380-390. Nature Publishing Group.
- Kuwabara, P. E., & O'Neil, N. (2001). The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 24(2), 127-138.
- Lacey, B. M., & Hondal, R. J. (2006). Characterization of mitochondrial thioredoxin reductase from *C. elegans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346, 629-636.
- Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, A.-M., Sirviö, J., Thomas, James H, Nass, R., et al. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *Journal of Neurochemistry*, 86(1), 165-172.
- Lancellotti, M., Pereira, R. F. C., Cury, G. G., & Hollanda, L. M. D. (2009). Pathogenic and opportunistic respiratory bacteria-induced apoptosis. *The Brazilian journal of infectious diseases*, 13(3), 226-231.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrad, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980.
- Lanza, I R, & Sreekumaran Nair, K. (2010). Regulation of skeletal muscle mitochondrial function: genes to proteins. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 199(4), 529-47.
- Lanza, Ian R, & Nair, K. S. (2009). Mitochondrial function as a determinant of life span. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 459(2), 277-289.
- Lapointe, J., & Hekimi, S. (2008). Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mcl1+/- mice. *The Journal of biological chemistry*, 283(38), 26217-27.
- Larsen, P. L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), 8905-9.

- Larsen, P. L., Albert, P. S., & Riddle, D. L. (1995). Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 139(4), 1567-1583.
- Larsson, N. G., Holme, E., Kristiansson, B., Oldfors, A., & Tulinius, M. (1990). Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatric Research*, 28(2), 131-136.
- Laurent, T. C., Moore, C. E., & Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, 239(10), 3436-3444.
- Lee, K.-H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schütze, S., et al. (2006). The role of receptor internalization in CD95 signaling. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 25(5), 1009-1023.
- Lee, K.-kwon, Murakawa, M., Takahashi, S., Tsubuki, S., Kawashima, S.-ichi, Sakamaki, K., et al. (1998). Purification, Molecular Cloning, and Characterization of TRP32, a Novel Thioredoxin-related Mammalian Protein of 32 kDa. *Biochemistry*, 273(30), 19160 -19166.
- Lee, S. R., Bar-Noy, S., Kwon, J., Levine, R. L., Stadtman, T. C., & Rhee, S. G. (2000). Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2521-6.
- Lee, S. S., Lee, R. Y. N., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., & Ruvkun, Gary. (2003). A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nature genetics*, 33(1), 40-8.
- Letai, A. (2006). Growth factor withdrawal and apoptosis: the middle game. *Molecular cell*, 21(6), 728-30.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., et al. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-89.
- Libina, N., Berman, J. R., Kenyon, Cynthia, & Francisco, S. (2003). Tissue-Specific Activities of *C. elegans* DAF-16 in the Regulation of Lifespan, 115, 489-502.
- Lillig, C.H., & Holmgren, Arne. (2007). Thioredoxin and Related Molecules—From Biology to Health and Disease. *Antioxidants & redox signaling*, 9(1), 25–47.
- Lin, K. (1997). daf-16: An HNF-3/forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 278(5341), 1319-1322.
- Lin, M. T., & Beal, M. Flint. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *October*, 443(October), 787-795.

- Link, C D. (2005). Invertebrate models of Alzheimer's disease. *Genes, brain, and behavior*, 4(3), 147-56.
- Link, C.D., Cypser, J. R., Johnson, C.J., & Johnson, T.E. (1999). Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. *Cell stress & chaperones*, 4(4), 235.
- Link, C., Johnson, C., Fonte, V., Paupard, M., Hall, David H, Styren, S., et al. (2001). Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34. *Neurobiology of aging*, 22, 217-226.
- Link, C., Silverman, M., Breen, M., Watt, K., & Dames, S. A. (1992). Characterization of *Caenorhabditis elegans* lectin-binding mutants. *Genetics*, 131: 867-881.
- Link, Christopher D. (2006). *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, 41(10), 1007-13.
- Link, Christopher D, & Johnson, Carolyn J. (2002). Reporter transgenes for study of oxidant stress in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in enzymology*, 353(1994), 497-505.
- Link, Christopher D, Taft, A., Kapulkin, V., Duke, K., Kim, S., Fei, Q., et al. (2003). Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, 24, 397-413.
- Link, Christopher D. (1995). Expression of human Beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(September), 9368-9372.
- Lints, R., & Hall, D. H. (2009). Reproductive system, overview. *WormAtlas*.
- Lipton, J. (2005). Mating worms and the cystic kidney: *Caenorhabditis elegans* as a model for renal disease. *Pediatric nephrology Berlin Germany*, 20(11), 1531-1536.
- Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S, & Johnson, T E. (1995). Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7540-4.
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
- Lundström, J., & Holmgren, Arne. (1990). Protein Disulfide-isomerase Is a Substrate for Thioredoxin and Has Thioredoxin-like Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9114-9120.
- Lustbader, J. W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H. W., Takuma, K., Wang, N., et al. (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*, 304(5669), 448-452.
- Luthman, M., & Holmgren, A. (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*, 21(26), 6628-6633.
- Makino, Y., Okamoto, K., Yoshikawa, N., Aoshima, M., Hirota, K, Yodoi, J, et al. (1996). Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid

- hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. *Journal of Clinical Investigation*, 98(11), 2469-2477.
- Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., et al. (1999). Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 3182-3188.
- Malone, E. A., Inoue, T., & Thomas, J. H. (1996). Genetic Analysis of the Roles of Daf-28 and Age-1 in Regulating Caenorhabditis Elegans Dauer Formation. *Genetics*, 143(3), 1193-1205.
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., & Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1437-1449.
- Mandavilli, B. S., Santos, J. H., & Houten, B. V. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Environmental Health*, 509, 127-151.
- Mandemakers, W., Morais, V. A., & De Strooper, B. (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 10), 1707-1716.
- Manini, T.M. (2010). Energy Expenditure and Aging. *Ageing research reviews*, 9(1), 1-11.
- Manini, Todd M, Everhart, J. E., Patel, K. V., Schoeller, D. a, Colbert, L. H., Visser, M., et al. (2006). Daily activity energy expenditure and mortality among older adults. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 296(2), 171-9.
- Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2685-2700.
- Masoro, E. J. (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Experimental gerontology*, 35(3), 299-305.
- Matsui, Minoru, Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, Junji, et al. (1996). RAPID COMMUNICATION Early Embryonic Lethality Caused by Targeted Disruption of the Mouse Thioredoxin Gene, 185(0208), 179 -185.
- Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Yodoi, J., & Hay, R. T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Research*, 20(15), 3821-3830.
- May, J. M., Mendiratta, S., Hill, K. E., & Burk, R. F. (1997). Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22607-22610.
- McFarland, R, Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2007). Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Current Topics in Developmental Biology*, 77(06), 113-155.

- McFarland, Robert. (2002). The neurology of mitochondrial DNA disease. *The Lancet Neurology*, 1(6), 343-351.
- McShane, M. A., Hammans, S. R., Sweeney, M., Holt, I. J., Beattie, T. J., Brett, E. M., et al. (1991). Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *The American Journal of Human Genetics*, 48(1), 39-42.
- Meek, S. E. M., Lane, W. S., & Piwnica-Worms, H. (2004). Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32046-32054.
- Meng, S.-J., & Yu, L.-J. (2010). Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1509-26.
- Meredith, S. C. (2005). Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066, 181-221.
- Merwin, J. R., Mustacich, D. J., Muller, E. G. D., Pearson, G. D., & Merrill, G. F. (2002). Reporter gene transactivation by human p53 is inhibited in thioredoxin reductase null yeast by a mechanism associated with thioredoxin oxidation and independent of changes in the redox state of glutathione. *Carcinogenesis*, 23(10), 1609-1615.
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., & Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual review of genetics*, 43(August), 335-67.
- Miranda-Vizuet, A., Damdimopoulos, A E, Pedrajas, J. R., Gustafsson, J. A., & Spyrou, G. (1999). Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 261(2), 405-412.
- Miranda-Vizuet, A., Damdimopoulos, A E, & Spyrou, G. (2000). The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxidants redox signaling*, 2(4), 801-810.
- Miranda-Vizuet, A, Ljung, J., Damdimopoulos, A E, Gustafsson, J. A., Oko, R, Peltto-Huikko, M, et al. (2001). Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31567-31574.
- Miranda-Vizuet, Antonio, Fierro González, J. C., Gahmon, G., Burghoorn, J., Navas, P., & Swoboda, P. (2006). Lifespan decrease in a *Caenorhabditis elegans* mutant lacking TRX-1, a thioredoxin expressed in ASJ sensory neurons. *FEBS letters*, 580(2), 484-90.
- Miranda-Vizuet, Antonio, & Spyrou, Giannis. (2002). Genomic organization and identification of a novel alternative splicing variant of mouse mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) gene. *Molecules and Cells*, 13(3), 488-492.
- Missirlis, F., Ulschmid, J. K., Hirosawa-Takamori, M., Grönke, S., Schäfer, U., Becker, Katja, et al. (2002). Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single *Drosophila* gene are both essential for viability. *The Journal of biological chemistry*, 277(13), 11521-6.

- Mitchell, P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 206(4423), 1148-1159.
- Mitsui, Akira, Hamuro, J., Nakamura, Hajime, Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., et al. (2002). Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxidants redox signaling*, 4(4), 693-696.
- Moos, P. J., Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E., & Fitzpatrick, F. A. (2003). Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 745-750.
- Moreira, P I, Cardoso, S. M., Santos, M. S., & Oliveira, C. R. (2006). The key role of mitochondria in Alzheimer's disease. *Journal Of Alzheimers Disease*, 9(2), 101-110.
- Morley, J. F., Brig, H. R., Weyers, J. J., & Morimoto, Richard I. (2002). The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10417-10422.
- Mukhopadhyay, A., Oh, S. W., & Tissenbaum, H. a. (2006). Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Experimental gerontology*, 41(10), 928-34.
- Murphy, C. T., Lee, S.-J., & Kenyon, Cynthia. (2007). Tissue entrainment by feedback regulation of insulin gene expression in the endoderm of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(48), 19046-50.
- Müftüoğlu, M., Elibol, B., Dalmazrak, O., Ercan, A., Kulaksiz, G., Ogüs, H., et al. (2004). Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Movement disorders official journal of the Movement Disorder Society*, 19(5), 544-8.
- Naoi, M., Maruyama, W., Yi, H., Inaba, K., Akao, Y., & Shamoto-Nagai, M. (2009). Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival. *Journal of neural transmission Vienna Austria 1996*, 116(11), 1371-1381.
- Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics*, 33(2), 129-137.
- Nemoto, S., Takeda, Kazuyo, Yu, Z.-X., Ferrans, V. J., & Finkel, T. (2000). Role for Mitochondrial Oxidants as Regulators of Cellular Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 20(19), 7311-7318.
- Nieto, C., Almendinger, J., Gysi, S., Gómez-Orte, E., Kaech, A., Hengartner, Michael O, et al. (2010). ccz-1 mediates the digestion of apoptotic corpses in *C. elegans*. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 12), 2001-2007.
- Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., & Powis, Garth. (2003). The Absence of Mitochondrial Thioredoxin 2 Causes Massive Apoptosis , Exencephaly , and Early Embryonic Lethality in Homozygous Mice. *Society*, 23(3), 916-922.

- Nordberg, Jonas, & Arnér, E. S. J. (2001). Review article: Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*, 24(7), 1311-7.
- Oka, T., Toyomura, T., Honjo, K., Wada, Y., & Futai, M. (2001). Four subunit a isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H⁺-ATPase. Cell-specific expression during development. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 33079-33085.
- Ola, M. S., Nawaz, M., & Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 351(1-2), 41-58.
- Oláhová, M., Taylor, S. R., Khazaipoul, S., Wang, J., Morgan, B. a, Matsumoto, K., et al. (2008). A redox-sensitive peroxiredoxin that is important for longevity has tissue- and stress-specific roles in stress resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19839-44.
- Ortiz, C. O., Etchberger, J. F., Posy, S. L., Frøkjær-Jensen, C., Lockery, S., Honig, B., et al. (2006). Searching for neuronal left/right asymmetry: genomewide analysis of nematode receptor-type guanylyl cyclases. *Genetics*, 173(1), 131-149.
- Osborne, S. A., & Tonissen, K. F. (2001). Genomic organisation and alternative splicing of mouse and human thioredoxin reductase 1 genes. *BMC Genomics*, 2, 10.
- Ott, A., Breteler, M. M., Van Harskamp, F., Claus, J. J., Van Der Cammen, T. J., Grobbee, D. E., et al. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ British Medical Journal*, 310(6985), 970-973.
- Palacino, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., et al. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18614-18622.
- Pan, K. Z., Palter, J. E., Rogers, A. N., Olsen, A., Chen, D, Lithgow, G. J., et al. (2007). Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 6(1), 111-119.
- Park, H.-J., Seong, Y.-M., Choi, J.-Y., Kang, S., & Rhim, H. (2004). Alzheimer's disease-associated amyloid beta interacts with the human serine protease HtrA2 / Omi. *Neuroscience Letters*, 357, 63-67.
- Parker, J. A., Connolly, J. B., Wellington, C., Hayden, M., Dausset, J., & Neri, C. (2001). Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13318-13323.
- Partridge, Linda, & Gems, David. (2002). Mechanisms of ageing: Public or private? *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 165-175.

- Patenaude, A., Ven Murthy, M. R., & Mirault, M.-E. (2004). Mitochondrial thioredoxin system: effects of TrxR2 overexpression on redox balance, cell growth, and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(26), 27302-14.
- Pearson, G. D., & Merrill, G F. (1998). Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5431-5434.
- Pérez, V. I., Cortez, L. A., Lew, C. M., Rodriguez, M., Webb, C. R., Van Remmen, H., et al. (2011). Thioredoxin 1 overexpression extends mainly the earlier part of life span in mice. *The journals of gerontology Series A Biological sciences and medical sciences*, 66(12), 1286-99.
- Perier, C., Tieu, K., Guégan, C., Caspersen, C., Jackson-Lewis, V., Carelli, V., et al. (2005). Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19126-19131.
- Petit, A., Kwarai, T., Paitel, E., Sanjo, N., Maj, M., Scheid, M., et al. (2005). Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34025-34032.
- Pfeiffer, R. F. (2007). Wilson's Disease. *Seminars in Neurology*, 27(2), 123-132.
- Poole, A. C., Thomas, R. E., Andrews, L. A., McBride, H. M., Whitworth, A. J., & Pallanck, L. J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1638-1643.
- Psarra, A.-M. G., Hermann, S., Panayotou, G., & Spyrou, Giannis. (2009). Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF-kappaB modulates glucocorticoid receptor and NF-kappaB signalling in HEK-293 cells. *The Biochemical journal*, 422(3), 521-31.
- Rackham, O., Shearwood, A.-M. J., Thyer, R., McNamara, E., Davies, S. M. K., Callus, B. A., et al. (2011). Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for development of specific inhibitors. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(6), 689-699.
- Rand, J. D., & Grant, C. M. (2006). The Thioredoxin System Protects Ribosomes against Stress-induced Aggregation. *Molecular Biology of the Cell*, 17(January), 387- 401.
- Rea, Shane L. (2005). Metabolism in the *Caenorhabditis elegans* Mit mutants. *Experimental Gerontology*, 40(11), 841-849.
- Rea, Shane L, Ventura, Natascia, & Johnson, Thomas E. (2007). Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS biology*, 5(10), e259.
- Rea, S., & Johnson, T E. (2003). A metabolic model for life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell*, 5(2), 197-203.

- Reddien, P. W., & Horvitz, H. R. (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology*, 2(3), 131-136.
- Reddy, P. H. (2007). Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons. *Antioxidants redox signaling*, 9(10), 1647-1658.
- Reichheld, J.-P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., & Meyer, Y. (2007). Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in Arabidopsis development. *The Plant cell*, 19(6), 1851-65.
- Reichheld, J.-P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., & Meyer, Y. (2005). AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 579(2), 337-342.
- Rhee, S G, Kim, K. H., Chae, H Z, Yim, M. B., Uchida, K., Netto, L. E., et al. (1994). Antioxidant defense mechanisms: a new thiol-specific antioxidant enzyme. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 738, 86-92.
- Rhee, Sue Goo, Chae, Ho Zoon, & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(12), 1543-1552.
- Riddle, Donald L. (1978). The Genetics of Development and Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*, 10(1), 1-16.
- Riddle, Donald L, Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R. (1997). *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Rigobello, M. P., Callegaro, M. T., Barzon, E., Benetti, M., & Bindoli, A. (1998). Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability. *Free Radical Biology & Medicine*, 24(2), 370-376.
- Rozing, M. P., Westendorp, R. G. J., Frölich, M., Craen, A. J. M. de, Beekman, M., Heijmans, B. T., et al. (2009). Human insulin/IGF-1 and familial longevity at middle age. *Aging*, 1(8), 714-22.
- Rundlöf, A.-K., & Arnér, E. S. J. (2004). Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxidants redox signaling*, 6(1), 41-52.
- Rundlöf, A.-K., Janard, M., Miranda-Vizuete, Antonio, & Arnér, E. S. J. (2004). Evidence for intriguingly complex transcription of human thioredoxin reductase 1. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(5), 641-656.
- Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S., & Elpeleg, O. (2001). Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature Genetics*, 29(3), 342-344.
- Sadek, C M, Damdimopoulos, A E, Pelto-Huikko, M, Gustafsson, J. A., Spyrou, G, & Miranda-Vizuete, A. (2001). Sptrx-2, a fusion protein composed of one thioredoxin and three tandemly repeated NDP-kinase domains is expressed in human testis germ cells. *Genes to cells devoted to molecular cellular mechanisms*, 6(12), 1077-1090.

- Sadek, Christine M, Jiménez, A., Damdimopoulos, Anastasios E, Kieselbach, T., Nord, M., Gustafsson, J.-A., et al. (2003). Characterization of human thioredoxin-like 2. A novel microtubule-binding thioredoxin expressed predominantly in the cilia of lung airway epithelium and spermatid manchette and axoneme. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13133-13142.
- Safdar, A., Bourgeois, J. M., Ogborn, D. I., Little, J. P., Hettinga, B. P., Akhtar, M., et al. (2011). Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4135-40.
- Safdar, A., Hamadeh, M. J., Kaczor, J. J., Raha, S., Debeer, J., & Tarnopolsky, M. a. (2010). Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PloS one*, 5(5), e10778.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American Journal of Medicine*, 107(5), 489-506.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., et al. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 17(9), 2596-2606.
- Santorelli, F. M., Shanske, S., Macaya, A., DeVivo, D. C., & DiMauro, S. (1993). The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Annals of Neurology*.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., & Vécsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, 257(1-2), 221-39.
- Satyal, S. H., Schmidt, E., Kitagawa, K., Sondheimer, N., Lindquist, S., Kramer, J. M., et al. (2000). Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5750-5755.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., et al. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO Journal*, 17(6), 1675-1687.
- Schatz, G. (1995). Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta*, 1271, 123-126.
- Schon, E. A., & Manfredi, G. (2003). Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 111(3), 303-312.
- Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., & Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell metabolism*, 6(4), 280-93.
- Schwarze, S. R., Lee, C. M., Chung, S. S., Roecker, E. B., Weindruch, R., & Aiken, J. M. (1995). High levels of mitochondrial DNA deletions in skeletal

- muscle of old rhesus monkeys. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 83(2), 91-101.
- Schütze, S., Tchikov, V., & Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8), 655-62.
- Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A. I., Batterham, R. L., Claret, M., Clements, M., et al. (2008). Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(3), 807-818.
- Selman, C., Tullet, J. M. A., Wieser, D., Irvine, E., Lingard, S. J., Choudhury, A. I., et al. (2009). Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science*, 326(5949), 140-144.
- Shigenaga, M. K., & Ames, B. N. (1991). Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 10, 211-216.
- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M., Seibel, P., Ballinger, S. W., & Wallace, D C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, 61(6), 931-937.
- Sideris, D. P., & Tokatlidis, K. (2010). Oxidative protein folding in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxidants & redox signaling*, 13(8), 1189-204.
- Sifri, C. D., Begun, J., & Ausubel, F. M. (2005). The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiology*, 13(3), 119-127.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K L, Parrish, S., Timmons, L., et al. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107(4), 465-76.
- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E. M., et al. (2005). Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Human Molecular Genetics*, 14(22), 3477-3492.
- Smith, D. G., Cappai, R., & Barnham, K. J. (2007). The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(8), 1976-90.
- Soerensen, J., Jakupoglu, C., Beck, H., Förster, H., Schmidt, J., Schmahl, W., et al. (2008). The role of thioredoxin reductases in brain development. *PloS one*, 3(3), e1813.
- Solary, E., Droin, N., Bettaieb, a, Corcos, L., Dimanche-Boitrel, M. T., & Garrido, C. (2000). Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 14(10), 1833-49.
- Spelbrink, J N, Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., et al. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in

- the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genetics*, 28(3), 223-231.
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2000). The alpha-Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 16-27.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., M.-Y. Lee, V., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 839-840.
- Spyrou, G, Enmark, E., Miranda-Vizuet, a, & Gustafsson, J. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *The Journal of biological chemistry*, 272(5), 2936-41.
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology*, 36(9), 1539-50.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., & Brand, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784-44790.
- Stadtman, T. C. (1996). Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 83-100.
- Staniek, K., & Nohl, H. (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Science*, 1460, 268-275.
- Stenvall, J., Fierro-González, J. C., Swoboda, P., Saamarthy, K., Cheng, Q., Cacho-Valadez, B., Arnér, E.S.J., Persoon, O., Miranda-Vizuet, A. and Tuck, S. (2010). Selenoprotein TRXR-1 and GSR-1 are essential for removal of old cuticle during molting in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, 108 (3), 1064-1069.
- Stevenson, M. A., Pollock, S. S., Coleman, C. N., & Calderwood, S. K. (1994). X-Irradiation, Phorbol Esters, and H₂O₂ Stimulate Mitogen-activated Protein Kinase Activity in NIH-3T3 Cells through the Formation of Reactive Oxygen Intermediates Kinase Activity in NIH-3T3 Cells through the Formation of Reactive Oxygen Intermediate. *Cancer*, 54(1), 12-15.
- Stoneking, M. (1996). Mitochondrial DNA heteroplasmy: out of the closet. *Biological Chemistry*, 377(10), 603-604.
- Strauss, K., Martins, L., Plun-Favreau, H, Marx, F., Kautzmann, S., Berg, D., et al. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 14(15), 2099-2111.
- Studier, F W, & Moffatt, B. a. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1), 113-30.
- Studier, F. William. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207-234.
- Su, D., & Gladyshev, Vadim N. (2004). Alternative splicing involving the thioredoxin reductase module in mammals: a glutaredoxin-containing thioredoxin reductase 1. *Biochemistry*, 43(38), 12177-12188.
- Su, D., Novoselov, S. V., Sun, Q.-A., Moustafa, M. E., Zhou, Y., Oko, Richard, et al. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase.

- Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26491-26498.
- Suh, Y., Atzmon, G., Cho, M.-O., Hwang, D., Liu, B., Leahy, D. J., et al. (2008). Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3438-3442.
- Sulston, J. E. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1), 64-119.
- Sulston, J. E., Albertson, D. G., & Thomson, J. N. (1980). The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures. *Developmental Biology*, 78(2), 542-576.
- Sulston, J. E., & Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56(1), 110-56.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446.
- Swerdlow, R., & Khan, S. (2009). The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis: An Update. *Experimental neurology*, 218(2), 308-315.
- Swerdlow, R. H., & Khan, S. M. (2004). A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 63(1), 8-20.
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9), 621-32.
- Tamura, T., & Stadtman, T. C. (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1006-1011.
- Tan, M.-W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G., & Ausubel, F. M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2408-2413.
- Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, Hajime, Masutani, H., Ueda, S., et al. (2002). Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *The EMBO journal*, 21(7), 1695-703.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M. P., Yin, C. M., & Garofalo, R. S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends lifespan and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292(5514), 107-110.
- Tenor, J. L., McCormick, B. A., Ausubel, F. M., & Aballay, A. (2004). *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Current Biology*, 14(11), 1018-1024.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science*, 267(5203), 1456-62.

- Timmons, L., & Fire, a. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705), 854.
- Tiranti, V., Hoertnagel, K., Carrozzo, R., Galimberti, C., Munaro, M., Granatiero, M., et al. (1998). Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *American journal of human genetics*, 63(6), 1609-21.
- Tissenbaum, H. A., & Ruvkun, G. B. (1998). An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 148(2), 703-717.
- Tohyama, D., Yamaguchi, A., & Yamashita, T. (2008). Inhibition of a eukaryotic initiation factor (eIF2Bdelta/F11A3.2) during adulthood extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(12), 4327-37.
- Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A. T., Dufour, E., Khvorostov, I., et al. (2005). Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 17993-17998.
- Trotter, E. W., & Grant, C. M. (2005). Overlapping Roles of the Cytoplasmic and Mitochondrial Redox Regulatory Systems in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Society*, 4(2), 392-400.
- Tu, B. P., Ho-Schleyer, S. C., Travers, K. J., & Weissman, J. S. (2000). Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 290(5496), 1571-1574.
- Turanov, A. A., Su, D., & Gladyshev, Vadim N. (2006). Characterization of alternative cytosolic forms and cellular targets of mouse mitochondrial thioredoxin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22953-22963.
- Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, Kiichi, Sakai, T., et al. (1999). Thioredoxin-dependent Redox Regulation of p53-mediated p21 Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35809 -35815.
- Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., et al. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431(7005), 200-205.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., et al. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*, 252, 38-53..
- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D. Y., & Nagata, K. (2008). ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science*, 321(5888), 569-572.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J. J., & Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genetics*, 28(3), 211-212.

- Van Gorp, M., Festjens, N., Van Loo, G., Saelens, X., & Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 487-497.
- Van Raamsdonk, Jeremy M., & Hekimi, S. (2009). Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 5(2), e1000361.
- Van Raamsdonk, Jeremy Michael, & Hekimi, S. (2010). Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship? *Antioxidants & redox signaling*, 13(12), 1911-53.
- Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Yue, Kovacs, A. L., Orosz, L., & Müller, F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*, 426(6967), 620.
- Ventura, N, Rea, S L, & Testi, R. (2006). Long-lived *C. elegans* mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases. *Exp Gerontol*, 41(10), 974-991.
- Ventura, Natascia, & Rea, Shane L. (2007). *Caenorhabditis elegans* mitochondrial mutants as an investigative tool to study human neurodegenerative diseases associated with mitochondrial dysfunction. *Biotechnology journal*, 2(5), 584-95.
- Vignols, F., Mouaheb, N., Thomas, D., & Meyer, Y. (2003). Redox control of Hsp70-Co-chaperone interaction revealed by expression of a thioredoxin-like Arabidopsis protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4516-4523.
- Wajant, Harald. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296(5573), 1635-1636.
- Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A, Maeda, M., Yodoi, J, et al. (1990). Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8282-8286.
- Walker, G., Houthoofd, K., Vanfleteren, J. R., & Gems, David. (2005). Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 126(9), 929-937.
- Wallace, D C. (1982). Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiological reviews*, 46(2), 208-40.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science*, 283(5407), 1482-1488.
- Wallace, Douglas C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 359-407.
- Wang, M. C., O'Rourke, E. J., & Ruvkun, Gary. (2008). Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science (New York, N. Y.)*, 322(5903), 957-60.
- Wang, Xinglong, Su, B., Siedlak, S. L., Moreira, Paula I, Fujioka, H., Wang, Y., et al. (2008). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial

- dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19318-19323.
- Waterston, R. H. (1988). *Muscle*. In: *The nematode Caenorhabditis elegans*. (W. B. Wood, Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wei, S. J., Botero, A., Hirota, K., Bradbury, C M, Markovina, S, Laszlo, A., et al. (2000). Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Research*, 60(23), 6688-6695.
- Welsh, S. J., Bellamy, W. T., Briehl, M. M., & Powis, Garth. (2002). The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 62(17), 5089-5095.
- Wenick, A. S., & Hobert, O. (2004). Genomic cis-regulatory architecture and trans-acting regulators of a single interneuron-specific gene battery in *C. elegans*. *Developmental Cell*, 6(6), 757-770.
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philos T R Soc B*, 314(1165), 1-340.
- Winklhofer, K. F., & Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1802(1), 29-44.
- Wiseman, R. L., Chin, K.-T., Haynes, C. M., Stanhill, A., Xu, C.-F., Roguev, A., et al. (2009). Thioredoxin-related Protein 32 is an arsenite-regulated Thiol Reductase of the proteasome 19 S particle. *The Journal of biological chemistry*, 284(22), 15233-45.
- Wood, W. B. (1988). *The nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Xia, L., Nordman, T., Olsson, J. M., Dandimopoulos, A., Björkhem-Bergman, L., Nalvarte, I., et al. (2003). The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 278(4), 2141-6.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., et al. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275(5303), 1129-1132.
- Yasuda, K., Adachi, H., Fujiwara, Y., & Ishii, N. (1999). Protein carbonyl accumulation in aging dauer formation-defective (daf) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The journals of gerontology*, 54(2), B47-B51; discussion B52-B53.
- Yoneda, T., Benedetti, C., Urano, F., Clark, S.G., Harding, H.P., & Ron, D. (2004). Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *Journal of cell science*, 117(18), 4055.

- Young, T. J., Shah, A. K., Lee, M. H., & Hayes, D. L. (2005). Kearns-Sayre syndrome: a case report and review of cardiovascular complications. *Pacing and clinical electrophysiology*, 28(5), 454-457.
- Zeviani, Massimo, & Carelli, V. (2007). Mitochondrial disorders. *Current Opinion in Neurology*, 20(5), 564-571.
- Zhang, H., Go, Y.-mi, & Jones, Dean P. (2007). Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Cell*, 465, 119-126.
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*, 66(2 Suppl 1), S102-9.
- Zhang, R., Al-Lamki, R., Bai, L., Streb, J. W., Miano, J. M., Bradley, J., et al. (2004). Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circulation Research*, 94(11), 1483-1491.
- Zhang, Yingjie, Xing, D., & Liu, L. (2009). PUMA Promotes Bax Translocation by Both Directly Interacting with Bax and by Competitive Binding to Bcl-X L during UV-induced Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 3077-3087.
- Zhao, R., Masayasu, H., & Holmgren, Arne. (2002). Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8579-8584.
- Zhong, L., Arnér, E. S., Ljung, J., Aslund, F., & Holmgren, A. (1998). Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15), 8581-8591.
- Zhong, L., & Holmgren, A. (2000). Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18121-18128.
- Zhou, Jie, Damdimopoulos, Anastassios E, Spyrou, Giannis, & Brüne, B. (2007). Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia-inducible factor-1alpha. *The Journal of biological chemistry*, 282(10), 7482-90.
- Zhou, Jie, Eleni, C., Spyrou, Giannis, & Brüne, B. (2008). The mitochondrial thioredoxin system regulates nitric oxide-induced HIF-1alpha protein. *Free radical biology & medicine*, 44(1), 91-8.